

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

# **Experimenteller Nachweis von HPV-DNA im Endometriumkarzinom**

**Dissertation**

**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin**

**an der Medizinischen Fakultät der**

**Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

Vorgelegt von

Maresa Montag

aus Freising

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichtersteller: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ioannis Mylonas

Mitberichterstellerin: Prof. Dr. med. Eva-Maria Grischke

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Thomas Blankenstein

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2015

Meinen Großeltern und meinen Eltern gewidmet

In Erinnerung an Prof. Dr. Josef van Eimern

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Endometriumkarzinom.....</b>	<b>7</b>
1.1.1	Epidemiologie .....	7
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese.....	8
1.1.3	Histologie.....	9
1.1.4	Diagnostik.....	10
1.1.5	Staging und Prognose.....	10
1.1.6	Therapie und Prävention .....	11
<b>1.2</b>	<b>Humane Papillomaviren.....</b>	<b>12</b>
1.2.1	Taxonomie der Papillomaviren .....	12
1.2.2	Virus- und Genomaufbau .....	13
1.2.3	Infektion und Karzinogenese .....	14
1.2.4	Epidemiologie und Ätiologie .....	16
1.2.5	Diagnostik.....	17
1.2.6	Therapie und Prävention .....	18
<b>1.3</b>	<b>HPV und Endometriumkarzinom .....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungsmaterial .....</b>	<b>20</b>
3.1.1	Zellen .....	20
3.1.2	Gewebematerial .....	21
<b>3.2</b>	<b>In-situ-Hybridisierung .....</b>	<b>22</b>
3.2.1	In-situ-Hybridisierung mittels des GenPoint™ Systems (Dako) .....	22
3.2.1.1	Verwendete Sonde .....	22
3.2.1.2	Streptavidin-Biotin-Methode.....	23
3.2.1.3	Amplifikation .....	23
3.2.1.4	Gewebevorbereitung.....	24
3.2.1.5	Hybridisierung.....	25
3.2.1.6	Nachbehandlung.....	26
3.2.1.7	Immunhistochemischer Nachweis der DNA-Hybride.....	26
3.2.2	In-situ-Hybridisierung mittels des Zytofast® Systems (Zytomed) .....	27
3.2.2.1	Verwendete Sonde .....	27
3.2.2.2	Phosphatase-Biotin-Methode .....	28
3.2.2.3	Gewebevorbereitung.....	28

3.2.2.4	Hybridisierung.....	29
3.2.2.5	Nachbehandlung.....	29
3.2.2.6	Immunhistochemischer Nachweis der DNA-Hybride.....	29
3.2.3	Auswertung der In-situ-Hybridisierung.....	30
<b>3.3</b>	<b>PCR.....</b>	<b>32</b>
3.3.1	DNA-Extraktion.....	32
3.3.2	Amplifizierung.....	32
3.3.3	Visualisierung.....	33
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>33</b>
4.1	Sensitivitätstest.....	33
4.2	Vergleich Dako vs Zytomed.....	35
4.3	Auswertung der Gewebeschnitte.....	37
4.3.1	Überblick.....	37
4.3.2	HPV in malignem Endometriumgewebe.....	40
4.3.3	HPV in normalem Endometriumgewebe.....	47
4.4	HPV-Nachweis mittels PCR.....	49
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>50</b>
5.1	In-situ-Hybridisierung als geeignete Nachweismethode.....	51
5.2	Nachweis von HPV in den verschiedenen Endometriumkarzinomen.....	53
5.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	56
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>65</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	65
8.2	Verwendete Materialien.....	69
8.3	Klassifizierung des Endometriumkarzinoms nach TNM und FIGO (2009).....	73

<b>8.4</b>	<b>Grading.....</b>	<b>74</b>
<b>8.5</b>	<b>Bilderauswahl.....</b>	<b>75</b>
<b>8.6</b>	<b>Vorabpublikationen .....</b>	<b>79</b>
<b>8.7</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>79</b>

# **1 Einleitung**

Eine persistierende Infektion mit Humanen Papillomaviren (HPV) der High-Risk-Typen ist der bedeutendste Risikofaktor für die Entstehung des Zervixkarzinoms [88]. HPV wird in 99,7% aller Zervixkarzinome nachgewiesen, so dass eine Infektion mit humanen Papillomaviren vom High-Risk-Typ eine notwendige Voraussetzung für eine Malignomentstehung darstellt [86]. Ebenso werden 25% aller malignen Tumore der Mundhöhle durch eine Infektion mit anogenitalen HPV-Typen bedingt [93] und es gibt deutliche Hinweise, dass HPV bei der Karzinogenese einiger Kopf- und Hals-tumore beteiligt ist [28]. Im anogenitalen Bereich wurde HPV zudem bei Karzinomen des Penis [66], der Vagina [16], der Vulva [81] und des Anus [9] gefunden. HPV hat sich somit zu einem der wichtigsten bisher identifizierten Risikofaktoren der Krebs-entstehung herauskristallisiert.

Auf den in der Literatur kontrovers diskutierten Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und dem Endometriumkarzinom soll neben der Analyse eigener Versuchs-reihen in dieser Arbeit eingegangen werden.

## **1.1 Das Endometriumkarzinom**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Das Endometriumkarzinom ist der häufigste weibliche Genitaltumor in der westlichen Welt. In Deutschland gab es im Jahr 2007 ca. 11.000 neue Endometriumkarzinom-fälle, bei einer Inzidenzrate von 18/100.000 Einwohner [25]. Eine steigende Inzidenz in den Industrienationen erklärt man sich u.a. durch vermehrte Fettleibigkeit und geringere sportliche Aktivität der Bevölkerung [2], außerdem durch die gesteigerte Lebenserwartung [60]. Das Endometriumkarzinom tritt in 80% bei postmenopausalen Frauen auf, wobei das mittlere Erkrankungsalter 61 Jahre beträgt [74].

### 1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Wie es z.B. auch beim Kolonkarzinom beschrieben wird, vollzieht sich der Übergang von normalem Endometrium zum Karzinom durch eine schrittweise Anhäufung von Veränderungen der Zellregulation [67].

Etwa 10% aller Karzinomfälle treten familiär auf, häufig in Zusammenhang mit einem hereditären nicht-polyposis-assoziierten kolorektalen Karzinom HNPCC [67]. Die meisten Karzinomfälle (90%) treten jedoch sporadisch auf. Dabei wird ein dualistisches Model der Karzinogenese diskutiert. Auf der einen Seite ein „klassischer“ Entstehungsweg, bei dem der Tumor aus einem hyperplastischen Vorläufer in einem östrogenreichen Milieu wächst. Auf der anderen Seite ein „alternativer“ Entstehungsweg, der aggressivere Tumore hervorbringt, die weder mit einer Endometriumhyperplasie noch mit einem Östrogenexzess assoziiert sind [6, 48, 73].

Somit lassen sich die Karzinome des Endometrium weitestgehend in zwei Gruppen einteilen, Typ-I- und Typ-II-Karzinome. Das Endometriumkarzinom Typ-I ist entsprechend dem klassischen Weg östrogenabhängig, weist meist einen gut differenzierten Tumortyp mit endometrioider Morphologie auf, entwickelt sich charakteristischerweise aus einer vorangegangenen endometrialen Hyperplasie und zeichnet sich durch eine gute Prognose aus. Diese Gruppe umfasst ca. 80% aller sporadischen Endometriumkarzinome. Typische Risikofaktoren, die die Entwicklung eines solchen Karzinoms begünstigen, sind Faktoren, die einen Hyperestrogenismus hervorrufen. Dazu zählen: Langzeiteinnahme von Östrogenen ohne Gestagenschutz, Adipositas, anovulatorische Zyklen, frühe Menarche, späte Menopause, Nulliparität, polyzystisches Ovarialsyndrom (PCO) und Tumore, die Östrogen produzieren [60, 73-74]. Ein BMI über 25 kg/m<sup>2</sup> verdoppelt das Karzinomrisiko, ein BMI über 30 kg/m<sup>2</sup> verdreifacht es sogar [8]. Diese Östrogenstimulation führt u.a. zu einer gesteigerten mitotischen Aktivität in den endometrialen Zellen, woraus ein steigendes Risiko für Mutationen resultiert [60].

Das Typ-II-Karzinom hingegen ist gemäß dem alternativen Weg nicht östrogenabhängig, weist meist einen gering differenzierten Tumortyp von seröser oder klarzelliger Morphologie auf, tritt vor allem bei postmenopausalen Frauen auf ohne vorangegangene Hyperplasie und hat eher eine schlechte Prognose [67, 74]. Diese Tumore haben ein höheres Risiko zu metastasieren und ein Rezidiv zu entwickeln [2].



Spezielle Risikofaktoren konnten bisher abgesehen vom Alter der Patientin nicht identifiziert werden [73].

### 1.1.3 Histologie

Gemäß der WHO wird das Endometriumkarzinom folgendermaßen histologisch eingeteilt [82]:

- Endometrioides Adenokarzinom (ca. 80%)
- Muzinöses Karzinom (5%)
- Seröses Karzinom (5%)
- Klarzelliges Karzinom (5%)
- Gemischt-zelliges Karzinom
- Plattenepithelkarzinom
- Transitionalzell-Karzinom
- Kleinzelliges Karzinom
- Undifferenziertes Karzinom (1%)

Wie oben bereits erwähnt, zählen etwa 80% aller Karzinome zum endometrioiden Typ. Hierbei handelt es sich histologisch um drüsige Formationen ähnlich dem normalen Endometrium.

Während man die endometrioiden Tumore mittels Grading weiter unterteilen kann (s.u.), werden die serösen und klarzelligen Karzinome, welche je ca. 5% aller Karzinome ausmachen, per se als High-Grade-Tumore eingestuft [1]. Obwohl die nicht endometrioiden Adenokarzinome nur einen geringen Teil aller Karzinome ausmachen, sind sie für 50% aller Rezidive und Todesfälle verantwortlich [1-2].

Die serösen Karzinome, die den Prototyp der Typ-II-Karzinome darstellen, zeichnen sich durch eine komplexe Drüsenarchitektur mit hochgradigen Kernatypien aus [52].

Ebenfalls etwa 5% aller Fälle machen die muzinösen Karzinome aus, welche meist gut differenziert sind, ähnlich den Adenokarzinomen eine gute Prognose haben und

auch wie diese behandelt werden [1]. Sie werden demnach zu den Typ-I-Karzinomen gezählt [52].

Adenosquamöse Endometriumkarzinome stellen endometrioides Adenokarzinome mit einer malignen Plattenepithelkomponente dar. Auch sie werden zur Gruppe der Typ-I-Karzinome gezählt [2]. Diese Tumore sind sehr selten und haben insgesamt eine schlechtere Prognose als reine Adenokarzinome [35].

Die sog. undifferenzierten Tumore (1%), die weder eine glanduläre noch eine squamöse Differenzierung haben, werden als High-Grade-Tumore betrachtet und haben eine Neigung zur Metastasierung [1]. Da sie ähnlich den serösen und klarzelligen Karzinomen mit einer schlechteren Prognose im Vergleich zu den Karzinomen mit endometrioider Differenzierung einhergehen, werden sie meist zu den nicht endometrioiden Typ-II-Karzinomen gezählt [11].

#### 1.1.4 Diagnostik

Eine abnormale uterine Blutung ist das häufigste Symptom eines Endometriumkarzinoms, weshalb sich jede postmenopausale Frau mit vaginaler Blutung einer weiterführenden Diagnostik unterziehen sollte. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei einer Frau mit postmenopausaler Blutung ein Karzinom vorliegt, beträgt 5-10%, steigt jedoch mit dem Alter und den oben erwähnten Risikofaktoren [31].

Als erster diagnostischer Schritt wird ein transvaginaler Ultraschall (TVU) empfohlen. Laut einer Studie liegt der negativ prädiktive Wert des TVU mit Messung der Endometriumsdicke  $<5\text{mm}$  bei 99% [47]. Bei Werten über diesem Grenzbereich sollte eine histologische Gewebeuntersuchung zur Sicherung der Diagnose durchgeführt werden [2]. Dies geschieht üblicherweise durch eine fraktionierte Abrasio in Kombination mit einer Hysteroskopie [46].

#### 1.1.5 Staging und Prognose

Seit 1988 wird das Endometriumkarzinom gemäß der FIGO-Klassifikation einem chirurgischen Staging unterzogen. Dabei werden sowohl die Tiefe der Myometrium-

infiltration sowie der extrauterine Befall miteinbezogen. Eine ausführliche Tabelle der aktuellen FIGO- und TNM-Klassifikation ist im Anhang aufgeführt.

FIGO-Stadium, Myometriuminvasion, histologischer Typ und Differenzierungsgrad (s. auch unter „Grading“ im Anhang) sind die relevantesten Prognosefaktoren. Die 5-Jahresüberlebensrate (JÜR) nach der FIGO-Stadieneinteilung sieht folgendermaßen aus: 85% in Stadium I, 75% in Stadium II, 45% in Stadium III und 25% in Stadium IV [2].

#### 1.1.6 Therapie und Prävention

Die wichtigste Therapieoption bei Endometriumkarzinom ist die Operation, bei welcher entweder offen oder laparoskopisch eine komplette Hysterektomie mit bilateraler Salpingo-Oophorektomie durchgeführt wird. Zudem werden die pelvinen und para-aortalen Lymphknoten entfernt, inklusive einer Peritoneallavage zum genaueren Staging. Frauen mit Typ-II-Karzinomen benötigen aufgrund des dem Ovarialkarzinom ähnlichen Ausbreitungsmusters eine von den Typ-I-Karzinomen abweichende Vorgehensweise. Hierbei werden neben der Hysterektomie, der bilateralen Adnexektomie sowie der pelvinen und paraaortalen Lymphonodektomie zusätzlich noch eine Omentektomie und multiple Biopsien von Peritonealgewebe durchgeführt [2, 74].

Eine adjuvante Radiotherapie sollte mit Ausnahme vom Tumorstadium IA G1/G2 grundsätzlich durchgeführt werden. Dies kann als externe Bestrahlung, als vaginale Brachytherapie oder als Kombination realisiert werden [2].

Sowohl für Typ-I- als auch für Typ-II-Karzinome gibt es in den Stadien I und II keinen Anhalt, dass eine adjuvante Chemo- oder Hormontherapie in einem besseren Outcome resultiert [2].

Eine geeignete Methode sein individuelles Karzinomrisiko zu senken ist das Beibehalten des Normalgewichtes und ausreichende körperliche Aktivität [39].

Ein Screeningprogramm zur Sekundärprävention des Endometriumkarzinoms fehlt bisher [45]. Von großer Wichtigkeit ist die Aufklärung der Frauen, dass jegliche postmenopausale Blutung abgeklärt werden sollte [2].

## 1.2 Humane Papillomaviren

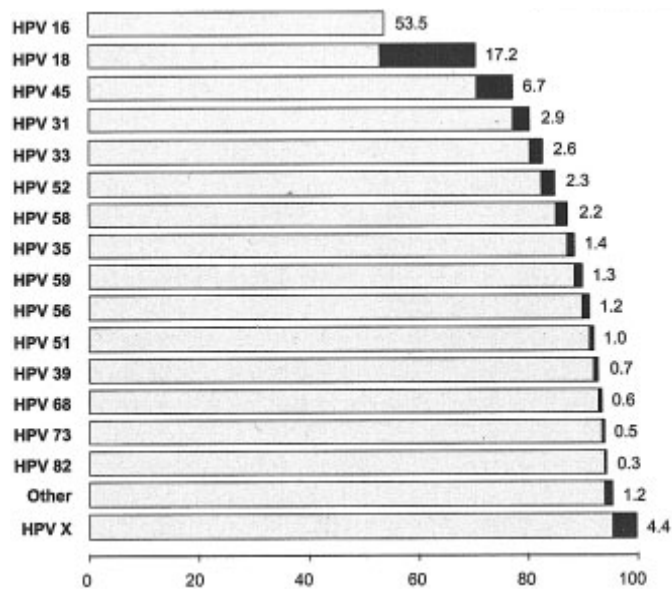
### 1.2.1 Taxonomie der Papillomaviren

Über 100 verschiedene humane Papillomaviren (HPV) konnten innerhalb der letzten 30 Jahre aus menschlichem Gewebe isoliert und voll sequenziert werden. Vorläufige Studienergebnisse deuten darauf hin, dass eine weitaus größere Zahl existiert [26]. Die äußerst heterogene Gruppe dieser Viren wird taxonomisch in verschiedene Ebenen eingeteilt: Familie, Genus, Spezies, Typ, Subtyp und Variante. Die Papillomaviren stellen eine eigene, vom International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) anerkannte Virusfamilie dar, die sog. *Papillomaviridae* [18].

Die Unterschiede in der Nukleinsäuresequenz des Genabschnittes L1 werden auf Grund der Stabilität dieses als Kriterium benutzt, um die Viren in die verschiedenen Ebenen einzuteilen [18].

Die zwei Hauptgenera, Alpha und Beta, beinhalten ca. 90% aller identifizierten HPV-Viren. Während die Beta-Gruppe typischerweise mit asymptomatischen Hautinfektionen assoziiert ist, gehören der Alpha-Gruppe die Viren an, die Infektionen des Anogenitalbereichs verursachen [21].

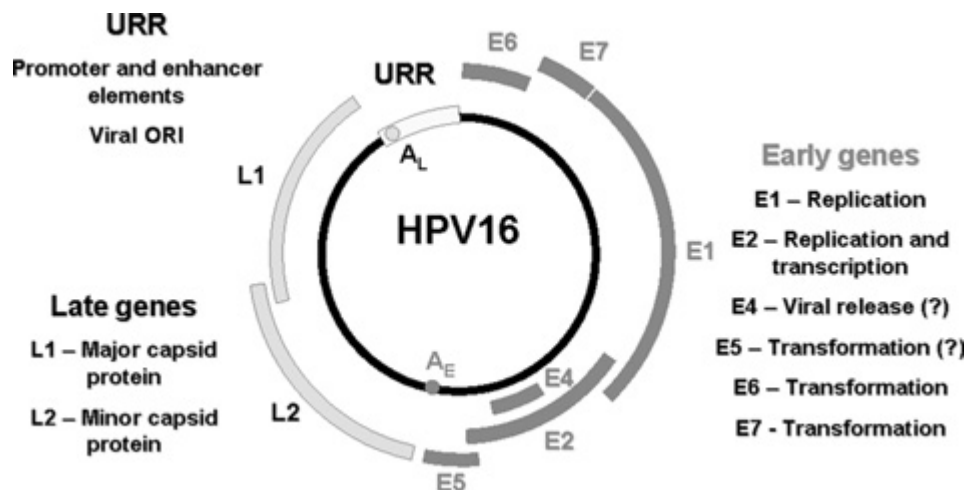
Neben der Einteilung auf Grund der Homogenität der Nukleotidsequenzen werden HPV der Alpha-Gruppe weiter nach ihrem transformierenden Potenzial klassifiziert: Low-Risk (LR) und High-Risk (HR) [21]. Vertreter der LR HPV-Gruppe (z.B. 6, 11, 42, 43, 44) werden überwiegend in benignen Epithelveränderungen, vor allem genitalen Warzen, nachgewiesen und haben keine Assoziation zu Präkanzerosen oder Karzinomen. Hervorzuheben sind vor allem die Genotypen 6 und 11, die für über 90% aller Condylomata acuminata verantwortlich gemacht werden [68]. 15 HR HPV-Typen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) [55] [68] stehen in Zusammenhang mit Präkanzerosen und sind mit über 90% aller Zervixkarzinome assoziiert [54, 57]. Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, verursachen die HPV-Genotypen 16 und 18 dabei zusammen 70,7% aller Zervixkarzinome [54]. Diese beiden HPV-Typen wurden 1995 offiziell von der WHO als Karzinogene anerkannt [88].



**Abb. 1:** Übersicht über die prozentualen Anteile an Zervixkarzinomen verursacht durch die häufigsten HPV-Genotypen. HPV 16 ist mit 53,5% der häufigste Verursacher eines Zervixkarzinoms [54].  
*Nachgebildet mit Erlaubnis von John Wiley & Sons und Copyright Clearance Center des International Journal of Cancer*

### 1.2.2 Virus- und Genomaufbau

Papillomaviren bestehen aus einem Kapsid, welches aus zwei unterschiedlich großen Strukturproteinen gebildet wird. Sie besitzen keine umgebende Membranhülle, weshalb sie äußerst stabil und resistent gegenüber therapeutischen Ansätzen sind [57]. Der ca. 55 nm im Durchmesser große Virus besitzt ein zirkuläres doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Größe von fast 8 kb, bestehend aus bis zu 10 sog. open reading frames (ORF) [92] (s. Abb.2).



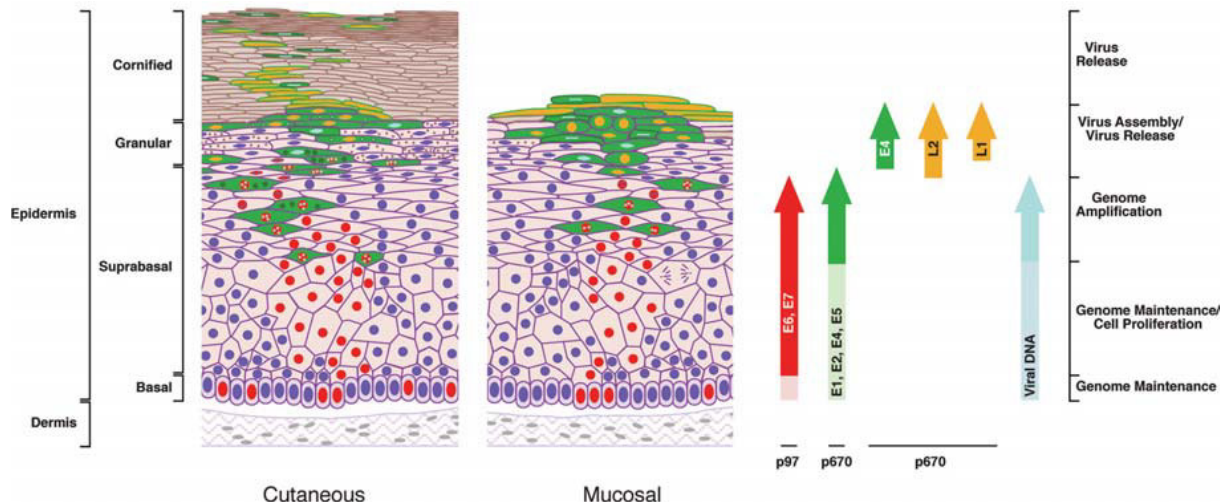
**Abb. 2:** Genomaufbau am Beispiel von HPV 16. Die ORFs E6, E7, E1, E2, E4 und E5 kodieren für Proteine, die für die Regulation der viralen DNA-Replikation und Genexpression nötig sind, die ORFs L1 und L2 für die viralen Kapsidproteine. Die Transkription wird durch eine Sequenz, lokalisiert in der URR, reguliert. Dies geschieht im Zusammenspiel zahlreicher zellulärer Faktoren, wozu auch das Produkt von E2 gehört. [76] *Nachgebildet mit Erlaubnis von M.A. Stanley, M.R. Pett and N. Coleman, 2007, Biochemical Society Transactions, Vol. 35, 1456-1460. © The Biochemical Society*

Die Gene E6 und E7 kodieren dabei für die wichtigsten HPV-Proteine, sie zählen zu den Onkogenen, da sie durch ihre zelltransformierenden Eigenschaften eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese des Zervixkarzinoms spielen [26, 92]. Die Proteine der Gene E1 und E2 fungieren als wichtige Regulatoren der DNA-Replikation. Das E2-Protein unterdrückt die Transkription, indem es an einer spezifischen Bindungsstelle der URR andockt, was durch das E1 Protein zusätzlich unterstützt wird [83].

### 1.2.3 Infektion und Karzinogenese

Die Karzinogenese verläuft in 4 Schritten: Virusinfektion – Viruspersistenz – Progression hin zu einer präkanzerösen Läsion – Lokale Invasion [68].

HPV sind epitheliotrop, d.h. die Infektion mit HPV benötigt den Zugang zu epidermalen oder mukösen Epithelzellen. Diese dürfen die Fähigkeit zur Proliferation noch nicht eingebüßt haben, wie es bei den Stammzellen der Basalzellschicht des Oberflächenepithels der Fall ist [92].



**Abb. 3:** Der virale Lebenszyklus. In der Graphik ist die Epidermis und die darunter liegende Dermis dargestellt. Die roten Zellkerne markieren E6- und E7-exprimierende Zellen, wobei das Auftreten dieser Zellen über der Basalschicht die Konsequenz einer Virusinfektion ist. Die in grün gezeichneten Zellen mit rotem Kern markieren die Zellen, die bereits virale Proteine für die Genomreplikation exprimieren. Die Expression der gelben L1 und L2 Gene geschieht in den oberen Epithelschichten aus Zellen heraus, welche die replizierte virale DNA enthalten. [21] *Nachgebildet mit Erlaubnis von John Doorbar, 2006, Clinical Science, 110, 525-541. © The Biochemical Society*

In Abbildung 3 ist der virale Lebenszyklus schematisch dargestellt, von der Viruspersistenz über die Infektion hin zur Desquamation kompletter infektiöser Viruspartikel.

Wie andere DNA-Viren muss auch das humane Papillomavirus den Wirtszellapparat für die Virus-DNA-Replikation nutzen. Wenn eine HPV-Infektion zum Karzinom fortschreitet, wird deshalb die episomale DNA des Virus in die DNA des Wirts integriert. In HPV-positiven Zervixkarzinomen ist die HPV-DNA üblicherweise in die chromosomale DNA integriert, während sie bei dysplastischen Läsionen der Zervix normalerweise noch extrachromosomal vorliegt [38]. Durch den Einbau der Virus-DNA in die Wirts-DNA geht ein großer Teil des Virusgenoms verloren [70]. Unter anderem verschiebt sich so das Verhältnis der Genprodukte E1/E2, was sich in einem Wegfall der hemmenden Wirkung auf die Transkription der Gene E6 und E7 auswirkt [83]. Die Proteine dieser Gene verursachen daraufhin eine Transformation der befallenen Zellen und durch Interaktionen mit den Tumorsuppressor-Genprodukten p53 [87] bzw.

RB [22] eine Blockade der Apoptose, welche normalerweise bei Schädigung der DNA veranlasst wird. Die Wachstumskontrolle der persistent infizierten Zelle fällt weg, was sich in einer Immortalisierung und Anhäufung chromosomaler Mutationen auswirkt [56]. Diese kanzerogenen Eigenschaften werden nur den High-Risk-HPV, v.a. HPV 16 und 18, zugeschrieben, da E6 von Low-Risk-HPV wesentlich schwächer an p53 bindet und somit den Zellumsatz nicht steigern kann [83]. Die Integration der Virus-DNA bedeutet für die befallene Zelle nicht nur ein unkontrolliertes klonales Wachstum, sondern auch eine gestiegene Instabilität des Genoms und somit eine größere Wahrscheinlichkeit, weitere Mutationen des Genoms zu erwerben, was letztlich zu malignen Veränderungen führt [76].

Grundsätzlich kann eine HPV-Infektion nach Eindringen in die Basalzellschicht nach einer gewissen Latenzzeit klinisch makroskopisch manifest werden, aber auch subklinisch oder gar vollständig latent verlaufen [83]. Jedoch nur ein geringer Teil der Infektionen kann sich der immunologischen Kontrolle entziehen und persistieren. Im weiteren Verlauf kann dieser Teil der Infektionen nach einer langen Latenzzeit in eine höhergradige Läsion bis hin zum Carcinoma in situ bzw. Zervixkarzinom fortschreiten. 15% aller Patientinnen mit einer HPV-Infektion entwickeln, falls unbehandelt, innerhalb von 2-3 Jahren eine intraepitheliale zervikale Neoplasie (CIN) oder ein Karzinom [57]. Welche Mechanismen es HPV ermöglichen, das Immunsystem so erfolgreich zu umgehen, ist bisher weitestgehend unbekannt.

#### 1.2.4 Epidemiologie und Ätiologie

Eine Infektion mit High-Risk-HPV ist eine weltweit verbreitete Infektion, die vor allem durch sexuellen Kontakt übertragen wird, wobei epitheliale Mikroverletzungen als Eintrittspforte der Viruspartikel diskutiert werden [92]. Die Anzahl der Partner stellt dabei den wichtigsten unabhängigen Risikofaktor dar [41, 53, 79]. Die weltweite Prävalenz von HPV beträgt etwa 10% [17]. Weitere Studien haben gezeigt, dass sich bis zu 80% aller sexuell aktiven Frauen im Laufe ihres Lebens mit einem oder mehreren HPV-Typen infizieren [77-78]. Die Virusprävalenz ist dabei bei Frauen unter 25 Jahren am höchsten und sinkt mit dem Alter [69, 77]. HPV 16 ist insgesamt der am häufigsten nachgewiesene Typ [90].



Da, wie bereits erwähnt, nicht jede Infektion zur Entstehung eines Karzinoms führt, muss es neben dem HPV-Typ noch weitere Cofaktoren geben, die diese Progression begünstigen. Anhaltende Immunsuppression ist z.B. ein Risikofaktor für virale Persistenz [62]: So sind Frauen mit einer HIV-Infektion oder nach Organtransplantation vermehrt von HPV-verursachten Karzinomen betroffen [32]. Auch über die Möglichkeit, dass genetische Faktoren eine Rolle spielen im Kampf des Immunsystems gegen die Persistenz von HPV, wurde bereits diskutiert [94].

Die meisten Frauen, die mit einem bestimmten HPV-Typ infiziert waren, zeigen nach 6-12 Monaten keinen Anhalt mehr für eine Infektion. 70% der Neuinfizierten sind innerhalb eines Jahres HPV-frei, nach zwei Jahren sind es sogar 90% [36, 64]. Jedoch liegen diagnostische Schwierigkeiten darin, ob eine nicht nachweisbare HPV-Infektion wirklich durch das Immunsystem des Wirtes erfolgreich beseitigt wurde oder ob die Infektion gerade eine Phase der Latenz durchlebt, die den Nachweismethoden entgeht [3]. Je länger HPV im Gewebe persistiert, desto unwahrscheinlicher wird die Bekämpfung durch das Immunsystem und desto höher das Risiko einer karzinogenen Entwicklung. Bei HPV 16 besteht nach 3-5 Jahren Viruspersistenz ein 40%iges Risiko für eine präkanzeröse Diagnose [68].

#### 1.2.5 Diagnostik

Im Bereich der zervikalen Infektionen wird die zytologische Untersuchung, der Pap-Abstrich, als diagnostisches Instrument verwendet, um eine HPV-Infektion nachzuweisen und um das Zervixkarzinom und seine Vorläufer zu erfassen [71].

Das Auftreten von sog. Koilozyten wird als morphologisches Kriterium für eine gegenwärtige Infektion mit Papillomaviren der Zervix gewertet [50, 65]. In Zusammenhang mit Kernatypien und verzögerter Zellreifung korreliert die Gegenwart von Koilozyten im Abstrichmaterial gut mit dem HPV-DNA-Nachweis mittels PCR [71]. Koilozyten sind durch HPV pathologisch veränderte Plattenepithelzellen, die sich durch eine Eulenaugenform auszeichnen. Diese kommt durch den geschrumpften Zellkern und den diesen umgebenden transparenten Hof zustande [93]. Sie wurden 1956 erstmals von Koss und Durfee beschrieben [44].

Der Nachweis von HPV-DNA durch direkte Hybridisierung mittels Hybrid Capture Assay (HC) oder durch PCR-Technik ist erprobt und kann das zytologische Screening mit guter Sensitivität erfolgreich ergänzen. Eine alleinige Anwendung des HPV-Nachweises bietet im Zervixkarzinomscreening darüber hinaus eine zu geringe Spezifität [93].

Der Vorteil des HPV-Nachweises durch eine In-situ-Hybridisierung ist der direkte Nachweis im Gewebe, jedoch ist diese Methode weniger sensitiv als PCR oder HC. Das bei anderen Erregern sonst übliche Verfahren der kulturellen Anzucht ist bei dem auf Mitose-fähiges Epithel angewiesenen HPV nicht durchführbar [76]. An weiteren Techniken des indirekten HPV-Nachweises der HPV-Infektion wird gearbeitet, so ist z.B. das Protein INK4A, ein Marker für die durch HR-HPV-Infektionen verursachte Inaktivierung der Zellzyklussteuerung [43].

#### 1.2.6 Therapie und Prävention

Die derzeit Erfolg versprechendste Methode zur Prävention einer HPV- Infektion und deren Folgen ist, neben der sexuellen Gesundheitserziehung, die polyvalente Impfung mit viralen Strukturproteinen, den Virus-Like-Particles (VLP) [68, 75].

Falls es bereits zu einer HPV- Infektion gekommen ist, liegt der Schwerpunkt der Behandlung auf der Beseitigung der klinischen Manifestationen, wie der Warzen bzw. Neoplasien, da eine Eliminierung des Virus bisher noch nicht möglich ist [57]. Impfstudien in einer therapeutischen Intention laufen derzeit, endgültige Ergebnisse stehen aber noch aus.

### 1.3 HPV und Endometriumkarzinom

Wie bereits zu Beginn der Einleitung erwähnt, spielt HPV nicht nur in der Entstehung des Zervixkarzinoms eine Rolle, sondern ist wohl auch ein entscheidender Faktor in der Karzinogenese einer Reihe weiterer Karzinome des Anogenitaltraktes. Unter anderem aufgrund der anatomischen Nähe ist es naheliegend, dass bereits einige Autoren durch Versuchsreihen einen möglichen Zusammenhang zwischen HPV und der Entstehung des Endometriumkarzinoms untersucht haben.

Wohl einer der ersten, der sich mit diesem Thema beschäftigt hat, war C. Bergeron, der 1988 mit seiner Arbeit an 20 Endometriumgewebeproben durch Southern Blot - Hybridisierung HPV-DNA nachzuweisen versuchte. Hierbei fiel das Ergebnis negativ aus [4]. In den Folgejahren versuchten sich verschiedene internationale Forscher an dieser Thematik mit den unterschiedlichsten Ergebnissen. Brewster et al. hatte 66 Endometriumkarzinomproben zur Verfügung, an denen der Nachweis von HPV-DNA mittels PCR in 2 Proben mit adenosquamöser Differenzierung gelang [7]. Ebenfalls mit Endometriumkarzinomproben mit mehr oder weniger starker plattenepithelialer Differenzierung beschäftigten sich Czerwenka et al. 1995. Diese kamen jedoch zu keinerlei positivem Nachweisergebnis durch die Anwendung des Hybrid Capture - Systems, auf welches in einem späteren Teil dieser Arbeit noch eingegangen wird. Zunehmend wurden auch Studien zu HPV im Zusammenhang mit Endometriumkarzinomen unterschiedlicher Histologie durchgeführt [59] [27] [72].

Insgesamt finden sich in der Literatur jedoch nur wenige, meist sehr kontroverse Forschungsarbeiten zum Nachweis von HPV im Endometriumkarzinom. Zudem stellte die Methode zum Nachweis von HPV-DNA die Autoren immer wieder vor ein Problem, denn die eine Methode der Wahl konnte sich bisher nicht etablieren.

## **2 Fragestellung und Zielsetzung**

Folgende Fragestellungen sollen in der vorliegenden Arbeit behandelt werden:

- 1) Welche Methode kann HPV-DNA in Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebetteten Geweben mit hoher Sensitivität nachweisen?
- 2) Spielt HPV in der Karzinogenese des Endometriumkarzinoms eine Rolle?
- 3) Wenn ja, gibt es diesbezüglich Unterschiede hinsichtlich der histologischen Subtypen des Endometriumkarzinoms?

Um diesen Fragen adäquat zu begegnen, sollten zunächst zwei In-situ-Hybridisierungstechniken einem Sensitivitätstest an standardisierten HPV-infizierten Zelllinien unterzogen werden. Darüber hinaus wird erläutert warum die ISH für die bestmögliche Methode zum Nachweis von HPV-DNA in Formalin-fixiertem und in

Paraffin-eingebetteten Geweben gehalten wird und somit für die Versuche ausgewählt wurde. Im Weiteren soll das bevorzugte Verfahren aus dem Sensitivitätstest an den zu untersuchenden Endometriumkarzinomproben angewandt werden. Dies geschieht stets mit geeigneten Negativ- und Positivkontrollen. Zur Auswertung der Testreihe dient der bereits etablierte immunoreaktive Score (IRS) von Remmele und Stegner. Mit diesem Verfahren sollen die verschiedenen histologischen Subtypen des Endometriumkarzinoms und das Normalgewebe objektiv miteinander verglichen und im Hinblick auf das Vorkommen von HPV-DNA analysiert werden.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Untersuchungsmaterial**

##### **3.1.1 Zellen**

Als Positivkontrollen und für den Sensitivitätsnachweis der durchgeführten Methoden wurden verschiedene humane Zervixkarzinom-Zelllinien verwendet, welche sich durch einen definierten Gehalt von HPV-DNA-Kopien pro Zelle auszeichnen [51, 61]:

- Ca Ski, 600 Kopien DNA HPV 16 (ATCC-Nr. CRL-1550<sup>TM</sup>)
- HeLa, 10-50 Kopien DNA HPV 18 (ATCC-Nr. CCL-2<sup>TM</sup>)
- SiHa, 1-2 Kopien DNA HPV 16 (ATCC-Nr. HTB-35<sup>TM</sup>)

Daneben wurden zwei weitere Zelllinien als Negativkontrollen in die Versuchsreihen mit eingebracht:

- MCF7 (ATCC-Nr. HTB-22<sup>TM</sup>)
- AC-1M32 (CABRI-Nr. ACC 441<sup>TM</sup>)

Während die Zellen der Linie MCF7 aus einem Adenokarzinom der Mamma stammen, handelt es sich bei der Linie AC-1M32 um Trophoblastenzellen aus humanem Chorionkarzinom.

Alle erworbenen Zellen wurden gemäß der vom Hersteller empfohlenen Richtlinien angezüchtet. Als Nährmedien wurde Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)

verwendet, welches 10 % fetales Kalbserum und Antibiotika (Penicillin und Streptomycin zu 100U/ml) enthält.

Nach Abschluss der Zellkultur wurde für die Herstellung von Cytospins eine Zellsuspension mit einer Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml angesetzt. Von dieser wurden jeweils 500µl auf einen Objektträger mit 150 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Die fertigen Objektträger wurden über Nacht luftgetrocknet und am nächsten Tag entweder sofort für eine Färbung verwendet oder bei -80°C aufbewahrt.

### 3.1.2 Gewebematerial

Für diese Arbeit wurden 59 Präparate von hysterektomierten Patientinnen mit Endometriumkarzinom verwendet, die in der Universitätsfrauenklinik der Ludwig-Maximilian-Universität in München zwischen 1979-2002 operiert wurden. Die Tumorgewebeproben wurden aus dem pathologischen Archiv des Klinikums entnommen. Die Endometriumkarzinome ließen sich in verschiedene histologische Subtypen einteilen, was neben dem FIGO-Stadium und dem histologischen Grading von einem Gynäkopathologen (Dr. med. Naim Shabani) mikroskopisch nochmals überprüft wurde.

Neben den Zelllinien als Kontrollmaterial wurden auch 23 Gewebeproben von normalen Endometrien verwendet. Diese stammten von Patientinnen, welche im Zeitraum von 2004 bis 2007 ebenfalls in der Universitätsfrauenklinik der Ludwigs-Maximilians-Universität in München vorwiegend aufgrund eines uterinen Leiomyoms eine Hysterektomie oder Kürettage erhalten haben. Die Endometriumproben wurden nach histologischen Kriterien in eine proliferative (Tag 1 bis 14), frühe sekretorische (Tag 15 bis 22) und späte sekretorische Phase (Tag 23 bis 28) eingeteilt.

Zusätzlich wurden Gewebeproben aus Zervixkarzinomen und benignem Zervixgewebe von Patientinnen, die größtenteils aufgrund eines Uterus myomatosus hysterektomiert wurden, als Kontrollmaterial herangezogen. Bei den Proben aus nicht kanzerösem Zervixgewebe wurde präoperativ mittels Hybrid-Capture-2-Test (Digene, Hilden, Deutschland) die HPV-Negativität bestätigt.

Als eine weitere negative Kontrollprobe diente humanes Gehirn-Gewebe, da sich in der Literatur kein Hinweis auf einen Zusammenhang zur Anwesenheit von HPV in Hirngewebe ergaben hatte.

Alle Gewebeproben lagen als in Formalin fixierte und in Paraffin gebettete Blöcke vor, von welchen für die ISH jeweils Serienschnitte von 4µm Dicke mit dem Schlittenmikrotom gewonnen und auf einen speziell für immunhistochemische Techniken beschichtete Objektträger aufgebracht wurden. Um Kontaminierungen zu vermeiden, wurde das Mikrotom nach jedem Gewebeblock gereinigt. Zum besseren Anhaften wurden die Schnitte über Nacht im Brutschrank bei 56-58°Grad getrocknet.

### **3.2 In-situ-Hybridisierung**

Es wurden zunächst zwei verschiedenen Verfahren der In-situ-Hybridisierung (ISH) angewandt und in Bezug auf Sensitivität und Anwendbarkeit bei in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben miteinander verglichen.

Im weiteren Verlauf wurde dann nur noch mit dem favorisierten GenPoint™ Kit von Dako gearbeitet.

Die Methode der ISH beruht auf der Paarung von komplementären Basen zwischen dem nachzuweisenden Genabschnitt und der zuvor hergestellten markierten Sonde. Nachdem die DNA in einem speziellen Hybridofen durch Hitze aufgetrennt wurde, erfolgt die eigentliche Hybridisierung. Die spezifisch gebundene Sonde wird im Anschluss durch eine Farbreaktion im Gewebe direkt nachgewiesen und lokalisiert, was dann mikroskopisch ausgewertet werden kann.

#### **3.2.1 In-situ-Hybridisierung mittels des GenPoint™ Systems (Dako)**

##### *3.2.1.1 Verwendete Sonde*

Für den immunhistochemischen Nachweis von HPV in Tumor- bzw. Kontrollgewebe wurde folgende Sonde verwendet:

GenPoint™ HPV Biotinylated DNA Probe von der Firma Dako (Code Y1443)

Diese Sonde reagiert laut Herstellerangaben nachweislich mit 13 High-Risk-HPV-Typen (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 und 68), wenn sie auf formalinfixiertem, paraffineingebetteten zervikalen Gewebe und/oder Zellen durch ISH angewendet

wird. Diese 13 HPV-Typen werden für 93,6% aller Zervixkarzinome verantwortlich gemacht [54].

#### *3.2.1.2 Streptavidin-Biotin-Methode*

Um die spezifisch an HPV-DNA gebundene Sonde sichtbar zu machen, wird das sogenannte Streptavidin-Biotin-System angewandt. Streptavidin ist ein Protein, gewonnen aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*, welches aus vier Untereinheiten besteht, von denen jede mit hoher Affinität ein Biotin-Molekül binden kann. Bei Biotin handelt es sich um ein wasserlösliches Vitamin der B-Gruppe.

Da in einem vorangegangenen Schritt das endogene Biotin blockiert wird (s.u.), bildet Streptavidin nur mit der spezifisch an HPV-DNA gebundenen biotinylierten Sonde einen Komplex. An diesen Komplex ist ein Enzym gekoppelt, die Peroxidase, gewonnen aus der Wurzel des Meerrettichs, welche mit dem Substratpuffer  $H_2O_2$  als Katalysator durch Oxidation des Chromogens (in diesem Fall Diaminobenzidin = DAB) eine braune Farbreaktion hervorruft. Ebenso wie das endogene Biotin wird vorab auch die endogene Peroxidase, die sich hauptsächlich in Granulozyten, Mastzellen und Erythrozyten befindet, blockiert (s.u.) um unspezifische Farbreaktionen zu verhindern.

Das Streptavidin-Biotin-System ist eine Abwandlung des ABC-Systems (Avidin-Biotin-Komplex), wobei man Avidin durch Streptavidin ersetzt hat, da dieses als gentechnisch hergestelltes reineres Produkt zu weniger unspezifischen Reaktionen führt als das aus Hühnereiweiß gewonnene Glykoprotein Avidin [58].

#### *3.2.1.3 Amplifikation*

Das Charakteristische am GenPoint™ System ist, dass die Streptavidin-Biotin-Methode durch einen Amplifikationsschritt ausgeweitet wird, indem man nach Zugabe des Peroxidase-gebundenen Streptavidins die Proben mit einem Amplifikationsreagenz inkubiert. Dies verspricht eine höhere Sensitivität der zu beurteilenden Farbreaktion. In dieser Arbeit wird Biotinyltyramid verwendet, ein Tyramidmolekül, an das mehrere Biotinmoleküle gebunden sind. Die an das primäre Streptavidin gekoppelte Peroxidase aktiviert Tyramid und der Komplex präzipitiert, so dass mehrere Biotin-Moleküle am Ort der markierten Sonde zu liegen kommen. Nun wird in einem weite-

ren Schritt wieder eine Streptavidin-Lösung mit gebundener Peroxidase hinzugegeben, die schlussendlich DAB in einen braunen Farbstoff umsetzt.

#### *3.2.1.4 Gewebepvorbereitung*

Vor der ISH wird das Gewebe bzw. die Zellen einigen Vorbehandlungen unterzogen, um eine unspezifische Hybridisierung der Sonde mit anderen Strukturen als der Zielstruktur zu vermeiden und um unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen oder anderen Zellbestandteilen, die die Sonde binden könnten, zu verhindern. Die Vorbehandlungen erleichtern außerdem das Eindringen von Sonde und Nachweisreagenzien.

##### Entparaffinierung der Gewebepvorbereitungen

Für die Entparaffinierung werden die Gewebeschnitte drei Mal für jeweils 10 Minuten in Xylol eingetaucht. Anschließend erfolgt eine Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe, welche aus 100%igem, 96%igem und 70%igem Alkohol bestand. Abschließend werden die Schnitte 2 Mal für 3 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

##### Vorbereitung der Cytospins

Um die Cytospins für die ISH nutzen zu können, bedarf es keiner speziellen Vorbereitung, abgesehen vom schonenden Auftauen der Zellverbände bei Raumtemperatur und dem anschließenden Waschen in destilliertem Wasser.

##### Vorbehandlung mit Proteinkinase K

Vor allem die in Paraffin eingebetteten Gewebepvorbereitungen benötigen eine Vorbehandlung mit Proteinkinase K, um das Gewebe und im Besonderen die Nukleinsäuren für die Sonde zugänglicher zu machen, da die Proteinkinase K einen proteolytischen Abbau von Zellproteinen herbeiführt. Dafür werden die Schnitte 30 Minuten mit Proteinkinase K bei einer Konzentration von 1:1000 in destilliertem Wasser behandelt und anschließend 2 Mal 3 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.



Um für die Zellproben gleiche Versuchsbedingungen zu schaffen, werden diese ebenfalls mit Proteinkinase K inkubiert, zur Schonung der Einzelzellen allerdings nur 20 Minuten.

#### Blockierung der endogenen Peroxidase

Um eventuelle Hintergrundsignale durch endogene Peroxidase-Aktivität zu reduzieren, werden die Gewebeproben für 20 Minuten in 3%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Methanol-Gemisch bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger, die Kontrollzellen tragen, werden gleichsinnig mit 0,3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol-Lösung behandelt. Nach Ablauf der Einwirkzeit werden die Präparate 2 Mal 3 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen.

#### Blockierung des endogenen Biotins

Da die für die In-situ-Hybridisierung verwendete Sonde mit der Streptavidin-Biotin-Nachweis Methode (s.o.) arbeitet, ist es zur Reduktion von Hintergrundsignalen ebenfalls nötig, die Schnitte vor Zugabe der Sonde mit Avidin und Biotin zu behandeln um die endogene Streptavidin-Bindungsaktivität durch endogenes Biotin zu blockieren. Dafür wird das Biotin-Blocking-System der Firma Dako verwendet. Im Detail bedeutet dies, dass die Proben jeweils 10 Minuten mit der Avidin- und 10 Minuten mit der Biotin-Solution bei Raumtemperatur inkubiert werden. Dazwischen und danach werden die Proben jeweils 2 Mal 3 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen.

#### Trocknung

Um die vorbehandelten Gewebeproben und Zellen nun für die Hybridisierung nutzen zu können, müssen diese mindestens 10-15 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet werden.

##### *3.2.1.5 Hybridisierung*

Auf die getrockneten Präparate wird nun die biotinylierte HPV-DNA-Sonde aufgetropft und anschließend werden die Proben sorgfältig mittels Deckgläsern und einem speziellen Kleber luftdicht abgeschlossen. Bevor die eigentliche Hybridisierung be-

ginnen kann, müssen die Proben bei 92°C für 5 Minuten denaturiert werden. In einem speziellen Hybridofen werden die Proben dann für 18 Stunden bei 37°C inkubiert.

#### *3.2.1.6 Nachbehandlung*

Nach der Hybridisierung werden der Kleber und das Deckgläschen abgezogen und Reste durch 2 Mal 3-minütiges Waschen mittels TBST-Waschpuffer (= Tris-buffered Saline and Tween 20) entfernt. Um die überschüssige und unspezifisch gebundene Sonde von den Präparaten zu lösen, werden diese für 30 Minuten in einer stringenten Waschlösung (1:50 verdünntes Waschsubstrat), die auf 48°C erhitzt wird, inkubiert und danach 2 Mal 5 Minuten mit TBST gespült.

#### *3.2.1.7 Immunhistochemischer Nachweis der DNA-Hybride*

##### Detektion der DNA-Hybride

Der Nachweis der spezifisch gebundenen hybridisierten Sonde basiert wie bereits erwähnt auf der Streptavidin-Biotin-Methode. Die primäre Streptavidin-HRP-Lösung (= peroxidase-gebundenes Streptavidin) wird 1:100 in der mitgelieferten Lösung verdünnt und gemäß dem Hersteller 30 Minuten vor Einsatz angesetzt. Von diesem Ansatz werden jeweils 150µl auf die Objektträger gegeben und zusammen 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben werden anschließend mit TBST-Waschpuffer gespült. Bevor die Komplexe jedoch durch die Chromogenreaktion mittels DAB sichtbar gemacht werden, werden sie einem Amplifikationsschritt (s.o.) unterzogen, um das Signal der Farbreaktion zu verstärken. Dieser Versuchsabschnitt beinhaltet folgende Schritte: Zuerst werden die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Amplifikationsreagenz Biotinyltyramid inkubiert, danach 15 Minuten mit dem sekundären Streptavidin-HRP. Dazwischen und abschließend werden die Schnitte 2 Mal 5 Minuten in TBST-Waschpuffer gewaschen.

Die Präparate werden nun mit 150µl 1:50 in DAB-Substrat-Puffer-verdünntem DAB-Konzentrat bedeckt und 5 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Eintauchen der Objektträger in destilliertes Wasser gestoppt und die Proben werden nochmals 3 Mal 5 Minuten in diesem gewaschen.

### Gegenfärbung

Anschließend werden die Präparate mit saurem Hämalaun nach P. Mayer mit einem pH von 4,5 für 2 Minuten gegengefärbt und danach 5 Minuten in Leitungswasser gebläut.

Bei diesem pH-Wert werden nur die Kerne angefärbt, da nur sie noch eine negative Ladung haben. Dabei lagern sich die positiv geladenen basischen Farbstoffionen an die negativ geladene Phosphatgruppe der DNA im Kern an.

Das Auswaschen und Bläuen erfolgt in Leitungswasser in alkalischem Milieu.

### Konservierung

Zum Schluss werden die Gewebepreparate zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70%igen, 96%igen und 100%igen Alkohol dehydriert und dann zur Aufhellung in Xylol eingetaucht. Zur weiteren Konservierung werden die Präparate mit den Gewebeproben mit Vitro-Clud-Einschlussmittel eingedeckt, während die Zellen wässrig mit Aquatex-Einschlussmittel behandelt werden. Die Aufbewahrung erfolgt in für Objektträger geeigneten Mappen bei Raumtemperatur.

## 3.2.2 In-situ-Hybridisierung mittels des Zytofast® Systems (Zytomed)

### 3.2.2.1 Verwendete Sonde

Ähnlich der Sonde des Kit der Firma Dako wird auch hier mit einer biotinylierten HPV-Sonde gearbeitet, die gegen die L1-Sequenz von 5 High-Risk-HPV-Typen (16,18,31,33,35) gerichtet ist:

HPV HR-ISH Probe der Firma ZytoVision (Produkt Nr. T-1040)

Das Produkt ist speziell für den Nachweis von HPV mittels ISH in paraffineingebetteten Gewebe- und Zellproben bestimmt. Die 5 getesteten HPV-Typen werden für 77,6% aller Zervix-Karzinome verantwortlich gemacht [54].

### *3.2.2.2 Phosphatase-Biotin-Methode*

Anders als bei GenPoint™ von Dako verwendet Zytofast® von Zytomed eine andere Nachweisreaktion für die hybridisierten DNA-Moleküle. In diesem Fall wird die Detektion mittels der alkalischen Phosphatase erreicht durch die katalysierte Umsetzung von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT).

Beide Farbstoffe fallen dabei in unmittelbarer Nähe der AP-Moleküle aus und färben die Umgebung der markierten DNA-Sonde dunkelviolett an.

In der Versuchsdurchführung wird dies folgendermaßen erreicht: Die biotinylierte Sonde wird mit einem Anti-Biotin-Antikörper, an den das Enzym alkalische Phosphatase gebunden ist, inkubiert. Somit bindet die alkalische Phosphatase spezifisch an die gesuchten DNA-Abschnitte und kann dort den zugegebenen Farbstoff (AP-Substrat) umsetzen.

### *3.2.2.3 Gewebevorbereitung*

#### Entparaffinierung der Gewebeschnitte

Um die Gewebeschnitte von ihrem einbettenden Medium zu befreien, werden die Präparate 3 Mal 7 Minuten in Xylol inkubiert. Anschließend werden die Proben für 2 Mal 3 Minuten in 100%igen Alkohol getaucht und bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

#### Vorbehandlung mit Pepsin

Um auch bei dieser Technik einen optimalen Zugang zu denen im Kern befindlichen Nukleinsäuren zu erhalten, werden die Präparate einer Proteolyse mittels Pepsin unterzogen. Dieses wird kalt auf die Schnitte aufgetropft und für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird mit 100%igem Ethanol abgestoppt. Danach werden die Schnitte für 10 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) dehydriert und schließlich bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

#### *3.2.2.4 Hybridisierung*

Auf die luftgetrockneten Präparate wird nun die auf 37°C vorgewärmte Sonde aufgetragen (~12µl) und jeweils mit einem Deckgläschen und Fixogum luftdicht abgeschlossen. Ebenso wie bei der Hybridisierung mit dem Kit der Firma Dako müssen auch hier die Proben zunächst denaturiert werden, bevor sie der eigentlichen Hybridisierung unterzogen werden können. Dies geschieht durch 10-minütiges Erhitzen der Proben auf 75°C. Anschließend werden die Präparate im Hybridofen für 80 Minuten bei 37°C inkubiert.

#### *3.2.2.5 Nachbehandlung*

Nach Ablauf der vorgesehenen Hybridisierungszeit und vorsichtiger Entfernung der Deckgläschen werden die Schnitte für 5 Minuten in einem speziellen mitgelieferten Waschpuffer (25ml auf 500ml Aqua dest.) gewaschen.

Um auch bei dieser Methode überschüssige und unspezifisch gebundene Sonde von den Präparaten zu entfernen werden diese für 5 Minuten in auf 55°C erwärmten Waschpuffer inkubiert, 5 Minuten bei Raumtemperatur in Waschpuffer eingetaucht und abschließend mit destilliertem Wasser gewaschen.

Ab diesem Zeitpunkt ist es wichtig darauf zu achten, dass die Schnitte nun nicht mehr austrocknen.

#### *3.2.2.6 Immunhistochemischer Nachweis der DNA-Hybride*

##### *Detektion der DNA-Hybride*

Um die durch die Hybridisierung erzeugten DNA-Hybride sichtbar zu machen wird Alkalische Phosphatase (s.o.) verwendet. Gemäß den Herstellerangaben werden die Präparate für 40 Minuten bei 37°C mit AP-anti-Biotin-Solution inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit Waschpuffer bzw. destilliertem Wasser für je 2 Mal 2 Minuten werden die Proben weitere 40 Minuten bei 37°C mit AP-Substrat (NBT/BCIP) behandelt, was zu einer blau-violetten Farbreaktion führt. Damit es zu keiner extremen Färbung der Schnitte kommt, sollte die Reaktion regelmäßig überprüft werden. Die Reaktion wird durch dreimaliges 2-minütiges Waschen in destilliertem Wasser beendet.

### Gegenfärbung

Im Gegensatz zum Verfahren mit dem Kit der Firma Dako erfordern die Farbstoffe NBT/BCIP die Gegenfärbung mit Kernechtrot für maximal 1 Minute. Danach werden die Schnitte 5 Minuten im Leitungswasser gewässert und durch Eintauchen in einer aufsteigenden Alkoholreihe, gefolgt von Xylol, dehydriert und aufgehellt.

### Konservierung

Zur weiteren Konservierung der Schnitte werden diese mit Vitro-Clud-Einschlussmittel eingedeckt und in Objektträgermappen aufbewahrt.

#### 3.2.3 Auswertung der In-situ-Hybridisierung

Die Auswertung der Schnitte erfolgt mit Hilfe eines Lichtmikroskops gemäß dem immunoreaktiven Score (IRS) von Remmele und Stegner [63]. Dafür wird zunächst bei jedem Schnitt das Tumorgewebe bei Lupenvergrößerung (10-fach) aufgesucht und anschließend bei stärkerer Vergrößerung (25- bzw. 40-fach) beurteilt. Jede Färbereihe wird durch mitgeführte Positiv- und Negativproben (s.o.) kontrolliert.

Der verwendete immunoreaktive Score wurde ursprünglich für die quantitative Bewertung von Progesteron- und Östrogenrezeptoren auf der Oberfläche von tumorösem Mamma-Gewebe entwickelt, jedoch lässt er sich auch auf andere immunhistochemische Reaktionen übertragen. Der Wert für den Score setzt sich aus den Parametern Farbtintensität (Staining Intensity = SI) und dem Prozentsatz der immunhistochemisch positiven Zellen im Bezug auf das zu bewertende Gewebe (Percentage Points = PP) zusammen und wird aus dem Produkt beider Parameter berechnet.

Die Parameter werden wie folgt unterteilt:

*Farbintensität (SI)*

- 0 = keine Färbereaktion
- 1 = schwache Färbereaktion
- 2 = mäßige Färbereaktion
- 3 = starke Färbereaktion

*Prozentsatz positiver Zellen (PP)*

- 0 = keine positiven Zellen
- 1 = < 10% positive Zellen
- 2 = 10-50% positive Zellen
- 3 = 51-80% positive Zellen
- 4 = > 80% positive Zellen

Durch Multiplikation beider Parameter kann der Immunoreaktive Score (IRS) erhoben werden, wobei sich Werte zwischen 0 und 12 ergeben:

*Immunoreaktiver Score (IRS)*

- 0-1 = keine Expression
- 2-3 = schwache Expression
- 4-8 = mäßig starke Expression
- 9-12 = starke Expression

Eine einheitliche Definition, ab welchem IRS-Wert das Ergebnis als positiv gewertet werden soll, existiert derzeit noch nicht. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Färbereaktionen zum einen so ausgewertet, dass jeder Wert über 0 als positiv angesehen wurde, zum anderen wurde das Verfahren des Median Split angewandt, welches unter Einbezug aller analysierten Endometriumkarzinome einen Cut-off von  $IRS \geq 2$  ergab. Dies entspricht im Weiteren der Intensitätsgruppe 2.

### 3.3 PCR

#### 3.3.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus den verwendeten Zellen wird wie im Folgenden beschrieben bewerkstelligt: Eine Zellsuspension mit  $5 \times 10^6$  Zellen/ml wird in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) gewaschen und danach zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet 2 Mal in PBS (= Phosphate-buffered Saline) gewaschen und ein weiteres Mal zentrifugiert. In einem weiteren Schritt wird das Pellet in zwei verschiedenen Lösungen wieder aufgelöst: 1) 100mM KCl, 10mM Tris/HCl (pH 8,3) und 2,5mM  $MgCl_2$  2) 10mM Tris/HCl (pH 8,3), 2,5mM  $MgCl_2$ , 1% Tween 20 und 1% NP 40. Im Anschluss daran wird jeweils Proteinkinase K mit einer Endkonzentration von 500µl/ml in die Tubes hinzugegeben und diese über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Die eigentliche DNA-Isolierung wird mittels Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol in einem Verhältnis von 25:24:1 und Chloroform erreicht. Die wässrige Phase wird eine weitere Nacht mit einem Teil NaAc (pH 5,2) und 10 Teilen 100%igem Isopropanol bei -25°C inkubiert um eine Präzipitation zu bewirken.

Nach einem letzten Waschschrift mit 70%igem Ethanol werden die Pellets kurz luftgetrocknet und dann wieder in Wasser aufgelöst.

Die DNA-Extraktion aus den Gewebeproben wird auf ähnlichem Wege ausgeführt: Drei je 10µm dicke Proben werden von jedem Block abgeschnitten, in Tubes gegeben und 10 Minuten mit Xylol entparaffiniert. Durch mehrmaliges Zugabe von Ethanol, Zentrifugieren und Entfernen des Überstandes wird ein trockenes Pellet produziert. Die Pellets werden mit den oben genannten Lösungen über 1-2 Nächte angedaut. Die Endkonzentration der Proteinkinase sollte hier bei 1000µg/ml liegen. Die weiteren Versuchsschritte sind identisch der Extraktion aus Zellmaterial.

#### 3.3.2 Amplifizierung

Der Genabschnitt, der zu DNA Vermehrung benutzt wird, ist ein Teil des Gen E6 von HPV Typ 16, bestehend aus 261bp zwischen Basenpaar 75 und 336 des E6 Gens. Die angewendeten Primer lauten:



- 5'- TAT- AAT- ATT- AGA- ATG- TGT- GTA- CTG- 3' (forward primer)
- 5'- AGG- ACA- CAG- TGG- CTT- TTG- AC- 3' (reverse primer)

Um eine Probe von 50µl anzusetzen werden 25µl PCR Master Mix, je 2,5µl von jedem Primer und 17,5µl destilliertes Wasser mit 2,5µl DNA-Matrize gemischt und in einen Eppendorf Mastercycler® gegeben. Steriles Wasser dient als Negativkontrolle. Die PCR wird für alle Proben mit folgenden Bedingungen durchgeführt:

1 Zyklus: 94°C für 120s, 59°C für 30s und 72°C für 120s

14 Zyklen: 94°C für 15s, 59°C für 30s und 72°C für 20s

44 Zyklen: 94°C für 15s, 59°C für 30s und 72°C für 30s

Abschließender Schritt: 72°C für 120s

### 3.3.3 Visualisierung

Nach Abschluss des Amplifikationsschrittes wird zu den PCR-Produkten eine Loading Solution gegeben und die Proben auf einem 4%igen Agarose-Gel mit Ethidiumbromid für mindestens 30 Minuten voneinander getrennt. Die Visualisierung der DNA-Fragmente wird unter UV-Licht erreicht.

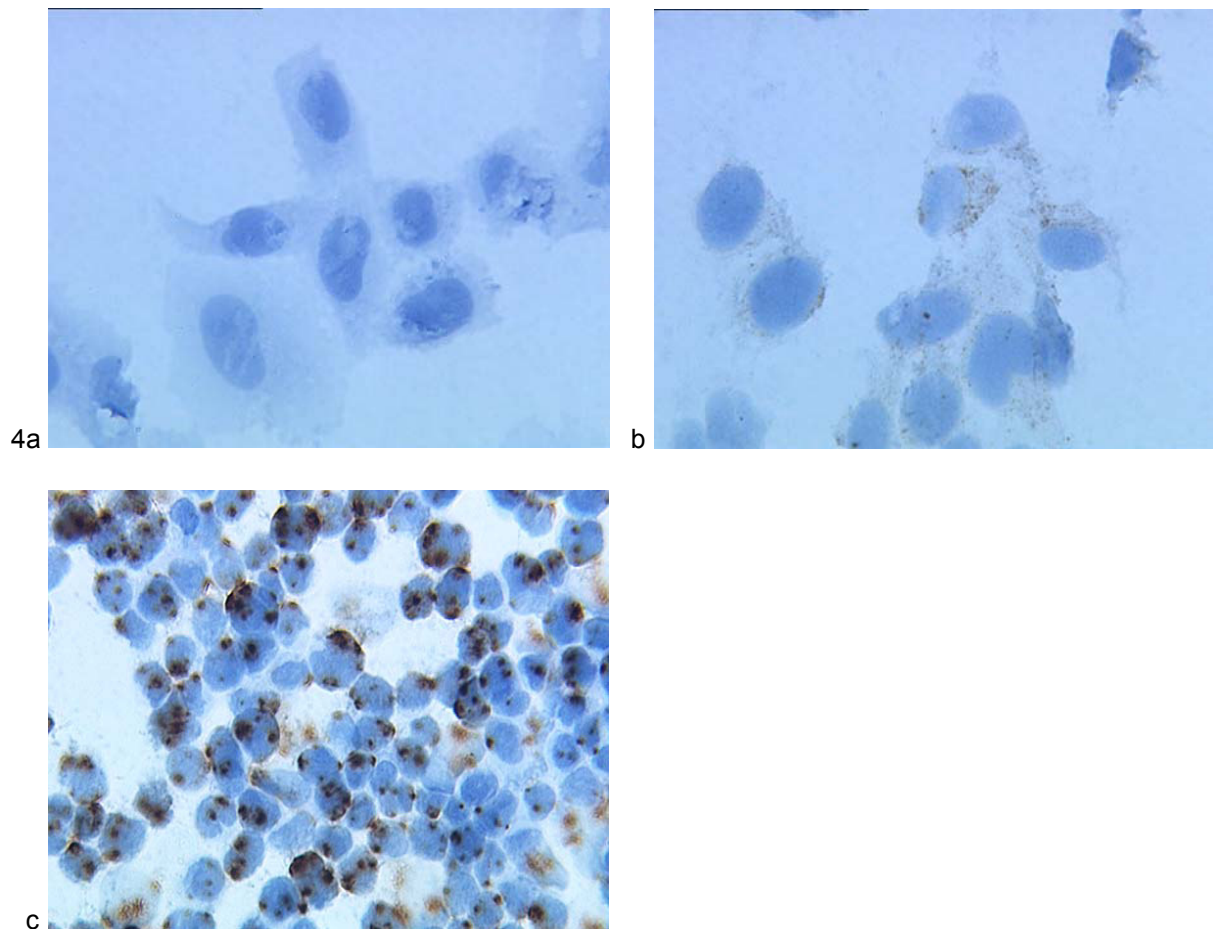
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Sensitivitätstest

Zu Beginn der Testreihe wurde die Sensitivität beider In-situ-Hybridisierungsmethoden in Bezug auf die Detektion von HPV untersucht. Dazu wurden 3 Zervixkarzinom-Zelllinien herangezogen, die jeweils einen definierten Gehalt von HPV-DNA-Kopien pro Zelle haben. Hierbei handelte es sich um die Zelllinien SiHa, HeLa und CaSki, die 1-2 Kopien von HPV-DNA-Typ 16 bzw. 10-50 Kopien von HPV-DNA-Typ 18 bzw. 600 Kopien von HPV-DNA-Typ 16 enthalten [51, 61]. Zwei Zelllinien ohne jegliche HPV-Infektion dienten als Negativkontrollen dieses Tests. Zum einen

die Trophoblasten-Zelllinie AC-1M32 und zum anderen die Brustkrebs-Zelllinie MCF7.

Wie zu erwarten war, zeigte der Test sowohl für das Verfahren mit dem Kit der Firma Zytomed sowie mit dem Kit der Firma Dako ein Detektionslimit von 10-50 Kopien HPV-DNA pro Zelle (s. Abb. 4a-c). Es ergaben sich keine falsch positiven Testergebnisse bei den Kontrollproben.



**Abb. 4a-c:** Sensitivitätstest mit dem GenPoint™ Kit von Dako: Nachweis von HPV 16 und 18 DNA in Zelllinien mit einem bekannten Gehalt an HPV Kopien pro Zelle. a SiHa (1-2 HPV 16 DNA Kopien/Zelle), 400x Vergrößerung, kein HPV Nachweis. b HeLa (10-50 HPV 18 DNA Kopien/Zelle), 400x Vergrößerung, schwacher HPV Nachweis. c CaSki (600 HPV 16 DNA Kopien/Zelle), 250x Vergrößerung, starker HPV Nachweis.

## 4.2 Vergleich Dako vs Zytomed

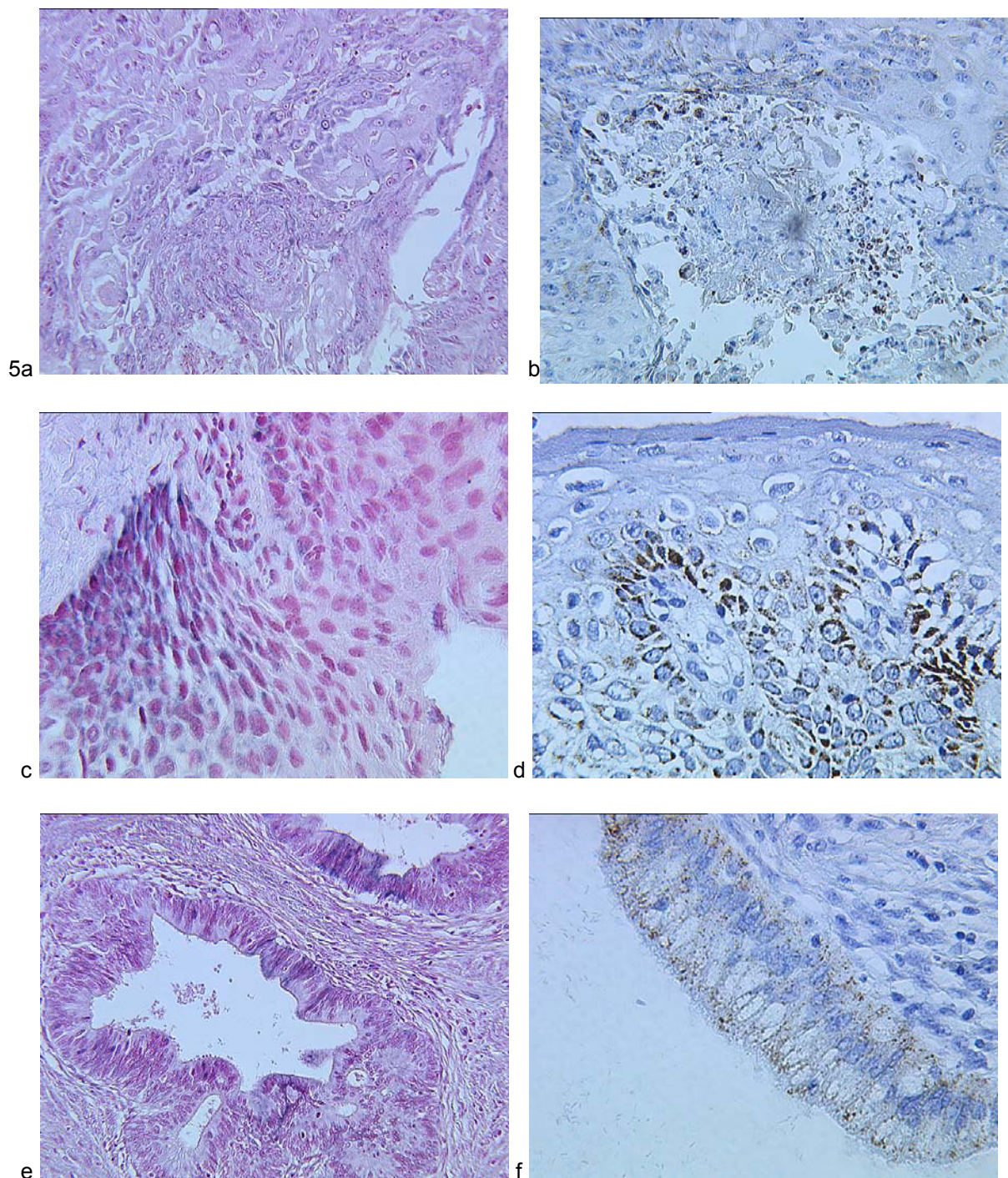
Vor der Analyse der Endometriumkarzinome wurden 10 Zervixkarzinome mit beiden Assays untersucht, um diese zu vergleichen und gegeneinander abzuwägen, da im weiteren Verlauf mit nur einem Kit weiter verfahren werden sollte.

Beide Verfahren arbeiten mit einer biotinylierten HPV-DNA-Probe, die für die Testung in Formalin fixiertem und Paraffin eingebettetem Gewebe geeignet ist. Während es mit dem Kit der Firma Dako möglich ist, 13 verschiedene HPV-Genotypen (Typ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59 and 68) nachzuweisen, welche für 93,6% aller Zervixkarzinome verantwortlich gemacht werden, kann der Kit der Firma Zytomed nur 5 HPV-Genotypen (Typ 16, 18, 31, 33 and 35) identifizieren, welche 77,6% aller Zervixkarzinome verursachen. Aus diesem Grund ist ein leicht stärkeres Signal mit dem GenPoint™-Kit zu erwarten.

Mit beiden Assays konnten starke Signale sowohl episomaler als auch integrierter HPV-DNA ab einer Kopienanzahl von 50 pro Zelle nachgewiesen werden. Alle 10 Zervixkarzinomproben wurden durch den Kit von Dako positiv getestet. Der Kit von Zytomed konnte nur bei 9 von 10 Proben ein positives Signal erzeugen. In Bezug auf die Histologie der Zervixkarzinome zeigte sich kein Unterschied in der positiven immunhistochemischen Reaktion zwischen Plattenepithel- und Adenokarzinomen. Auch bei dieser Testreihe gab es keine immunhistochemische Färbereaktion in Geweben der Negativkontrollen.

Ausschlaggebend für die Entscheidung, mit dem Kit der Firma Dako weiter zu arbeiten, war nicht nur das leicht bessere Ergebnis im Nachweis von HPV-DNA bei den Zervixkarzinomen, sondern auch die leichter zu interpretierende Farbreaktion von Dako. Dies mag zum einem im deutlicheren Kontrast der braunen Färbung durch oxidiertes DAB auf blauem Hintergrund begründet sein, der entscheidende Vorteil scheint jedoch im katalysierten Amplifikationssystem von Dako zu liegen. (s. hierzu Abb. 5a-f)





**Abb. 5a-f:** Vergleich des Zytofast HPV-Screening-CISH-Kit (linke Spalte), erkennbar an der blauen Färbung auf violetten Grund mit dem GenPoint Tyramide Signal Amplification System (rechte Spalte), erkennbar an der braunen Färbung auf blauem Grund. a, b Plattenepithelkarzinom der Zervix, 250x Vergrößerung. c, d Plattenepithelkarzinom der Zervix, 400x Vergrößerung. e, f Adenokarzinom der Zervix, 250x Vergrößerung.

### 4.3 Auswertung der Gewebeschnitte

Die Auswertung der normalen und karzinomatösen Gewebeschnitte erfolgte wie oben bereits erläutert durch den immunoreaktiven Score (IRS). Im Folgenden wurden zur Verdeutlichung jeweils die Ergebnisse, bei welchen ein IRS von  $\geq 1$  als positiv angesehen wurde (Intensitätsgruppe 1), denen gegenübergestellt, bei dem mit einem Cut-off von  $\geq 2$  gemäß dem Median-Split gearbeitet wurde (Intensitätsgruppe 2).

#### 4.3.1 Überblick

Insgesamt wurden 59 verschiedene Proben von Endometriumkarzinomen auf das Vorhandensein von HPV-DNA untersucht, wobei 36 (61%) Gewebeproben von Typ-I-Karzinomen und 23 (38%) von Typ-II-Karzinomen stammten. Die Typ-I-Karzinome setzten sich aus 24 (66,7%) endometrioiden, 8 (22,2%) adenosquamösen und 4 (11,1%) muzinösen Adenokarzinomen zusammen. Die Typ-II-Karzinome beinhalteten folgende histologische Untergruppen: 15 (65,2%) seröse, 4 (17,4%) klarzellige und 4 (17,4%) undifferenzierte Karzinome.

Das mittlere Alter aller Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnose betrug 64,6 Jahre, mit einem Intervall von 40,2 bis 88,1 Jahre, wobei die Patientinnen der Typ-II-Karzinome mit 66,2 Jahren in dieser Studie ein um fast 5 Jahre höheres Durchschnittsalter aufwiesen als die Patientinnen der Typ-I-Karzinome mit 61,5 Jahren.

Bezogen auf die Differenzierung und das Tumorstadium lag folgende Verteilung vor (s. Tab. 1 bis 3): Die endometrioiden Adenokarzinome teilten sich mit je 12 Proben gleichermaßen in gut (G1) bis mäßig differenzierte (G2) Karzinome auf. Ebenso verhielt sich die Gruppe der muzinösen Karzinome mit je 2 Proben. Je 3 Proben der adenosquamösen Karzinome wurden als G1 bzw. G3 gewertet, eine weitere Probe als G2 eingestuft. Von einer Probe lag kein Differenzierungsgrad vor. Bei den serösen Karzinomen fiel mit 3, 4 bzw. 8 Proben die Verteilung in einer aufsteigenden Tendenz in Richtung schlecht differenzierte Karzinome aus. Die klarzelligen und undifferenzierten Karzinome hingegen wiesen mit 75 bzw. 100% in der Gruppe G3 insgesamt eine niedrige Differenzierung auf. Im Gesamten zählte bei den Typ-II-Karzinomen mit 65,2% (15 Proben) zwei Drittel zu den G3-differenzierten Tumoren.

Ein FIGO-IV-Stadium wies keine der 59 verwendeten Proben auf. Die endometrioiden Adenokarzinome verteilten sich mit 13 Proben vor allem auf das frühe FIGO-I-Stadium (54,2%). 3 Patientinnen (12,5%) wiesen in dieser Gruppe ein fortgeschrittenes FIGO-III-Stadium auf. Die frühesten Stadien zeigten sich bei den muzinösen Karzinomen mit je 2 Proben aus der Gruppe FIGO I und II. Es lag keine Klassifizierung bezüglich des FIGO-Stadiums bei den adenosquamösen Karzinomen vor.

Bei den Typ-II-Karzinomen fiel die Verteilung eher zu Gunsten einer schlechteren Klassifizierung aus. Die serösen Karzinome stammten mit 8 Proben (53,3%) vor allem von Patientinnen mit FIGO-III-Stadium. Die Proben mit einer klarzelligen Histologie verteilten sich gleichmäßig mit je 2 Proben auf FIGO II und III. Bei den 4 undifferenzierten Karzinomen fiel das Ergebnis mit 100% FIGO-III-Klassifizierung eindeutig aus. Insgesamt wiesen die Typ-II-Karzinome eine fortgeschrittenere FIGO-Klassifizierung auf: 60,9% FIGO III, 30,4% FIGO II und nur 8,7% FIGO I.

Typ-I-Karzinome				
		endometrioid	adenosquamös	muzinös
		(n=24)	(n=8)	(n=4)
Alter	< 65	14 (58.3%)	6 (75.0%)	3 (75.0%)
	≥ 65	10 (41.7%)	2 (25.0%)	1 (25.0%)
	Ø Jahre	65,3	60,2	59,0
			(n=7, da eine Probe ohne Grading)	
Grading (WHO)	G1	12 (50.0%)	3 (42,85%)	2 (50.0%)
	G2	12 (50.0%)	1 (14,3%)	2 (50.0%)
	G3	0 (0%)	3 (42,85%)	0 (0%)
FIGO-Stadium	FIGO I	13 (54.2%)		2 (50.0%)
	FIGO II	8 (33.3%)		2 (50.0%)
	FIGO III	3 (12.5%)		0 (0%)
	FIGO IV	0 (0%)		0 (0%)

**Tab. 1:** Übersicht über die klinisch-pathologischen Eigenschaften der ausgewerteten Typ-I-Karzinome

	Typ-II-Karzinome			
		Serös (n=15)	klarzellig (n=4)	undifferenziert (n=4)
Alter	< 65	6 (40.0%)	3 (75.0%)	2 (50.0%)
	≥ 65	9 (60.0%)	1 (25.0%)	2 (50.0%)
	Ø Jahre	66,1	62,6	70
Grading (WHO)	G1	3 (20.0%)	0 (0%)	0 (0%)
	G2	4 (26.7%)	1 (25.0%)	0 (0%)
	G3	8 (53.3%)	3 (75.0%)	4 (100%)
FIGO-Stadium	FIGO I	2 (13.3%)	0 (0%)	0 (0%)
	FIGO II	5 (33.3%)	2 (50.0%)	0 (0%)
	FIGO III	8 (53.3%)	2 (50.0%)	4 (100%)
	FIGO IV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

**Tab. 2:** Übersicht über die klinisch-pathologischen Eigenschaften der ausgewerteten Typ-II-Karzinome.

	Karzinome gesamt (Typ-I + Typ-II)			
		Typ I + II (n=59)	Typ I (n=36)	Typ II (n=23)
Alter	< 65	34 (57,6%)	23 (63,9%)	11 (47,8%)
	≥ 65	25 (42,4%)	13 (36,1%)	12 (52,2%)
	Ø Jahre	64,6	61,5	66,2
(abzüglich Probe ohne Grading)		(n=58)	(n=35)	(n=23)
Grading (WHO)	G1	20 (34,5%)	17 (48,5%)	3 (13,0%)
	G2	20 (34,5%)	15 (42,9%)	5 (21,8%)
	G3	18 (31,0%)	3 (8,6%)	15 (65,2%)
(weitere Daten ohne adenosquamöse Proben)		(n=51)	(n=28)	(n=23)
FIGO-Stadium	FIGO I	17 (33,3%)	15 (53,6%)	2 (8,7%)
	FIGO II	17 (33,3%)	10 (35,7%)	7 (30,4%)
	FIGO III	17 (33,3%)	3 (10,7%)	14 (60,9%)
	FIGO IV	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

**Tab. 3:** Übersicht über die klinisch-pathologischen Eigenschaften der gesamten ausgewerteten Karzinome

#### 4.3.2 HPV in malignem Endometriumgewebe

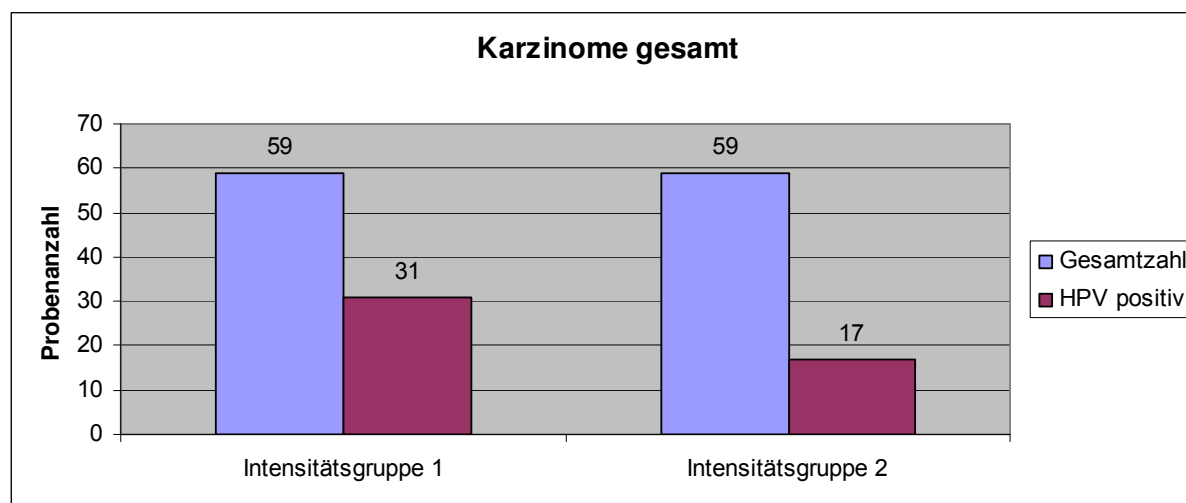
Betrachtet man alle untersuchten Karzinome zusammen, ergab sich bei 31 (52,5%) bzw. 17 (28,8%) aller Proben ein positiver HPV-Nachweis (s. Diagramm 1).

Von den 24 analysierten endometrioiden Adenokarzinomen zeigten 10 (41,2%) bzw. 4 (16,7%) Proben eine auf HPV positive Hybridisierungs-Reaktion (s. Diagramm 2).

Ebenso eine deutliche positive Reaktion konnte bei den 8 adenosquamösen Karzinomen nachgewiesen werden, von welchen bei 5 (62,5%) bzw. 3 (37,5%) Proben eine positive Färbungsreaktion erfasst werden konnte (s. Diagramm 3).

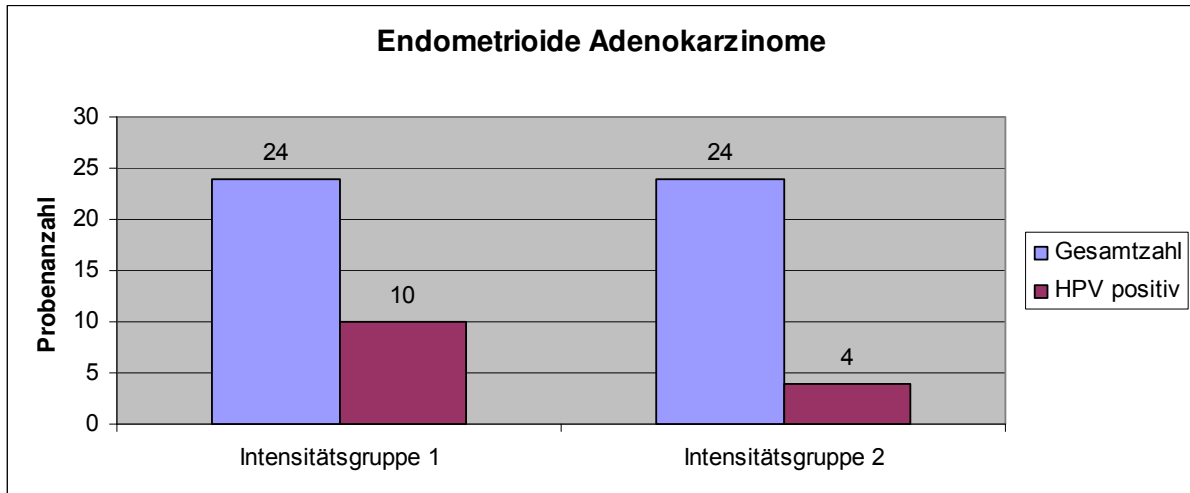
Bei den muzinösen Karzinomen wurden 2 (50%) bzw. 1 (25%) von 4 bearbeiteten Proben positiv getestet (s. Diagramm 4).

Betrachtet man die Typ-I-Karzinome gesamt, so zeigte sich bei 17 (47,2%) bzw. 8 (22,2%) aller Proben eine positive Wertung (s. Diagramm 5)

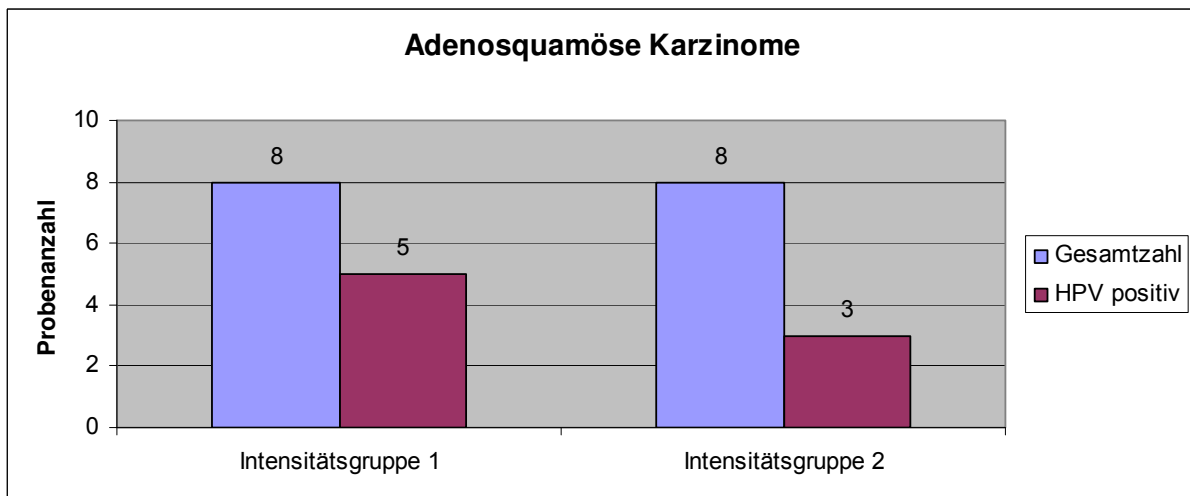


**Diagramm 1:** Karzinome gesamt – unterteilt in zwei Intensitätsgruppen. Bei Intensitätsgruppe 1 wurde der Cut off bei  $IRS \geq 1$  gewählt, bei Intensitätsgruppe 2 entsprechend bei  $IRS \geq 2$ . Somit ergeben sich 31 bzw. 17 HPV positive Karzinomproben, wenn man alle histologischen Subtypen zusammen betrachtet. Dies entspricht 52,5 bzw. 28,8 %.

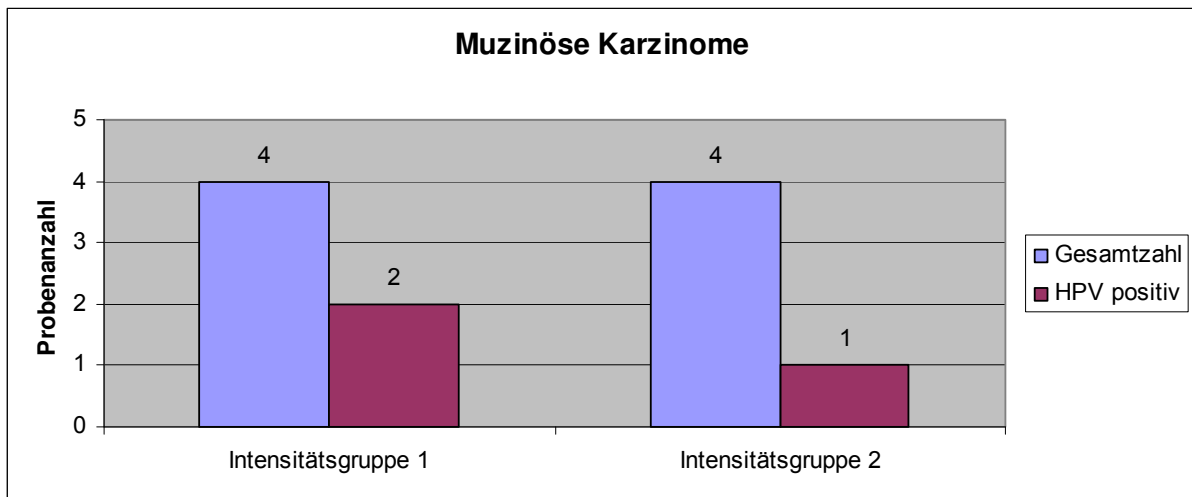




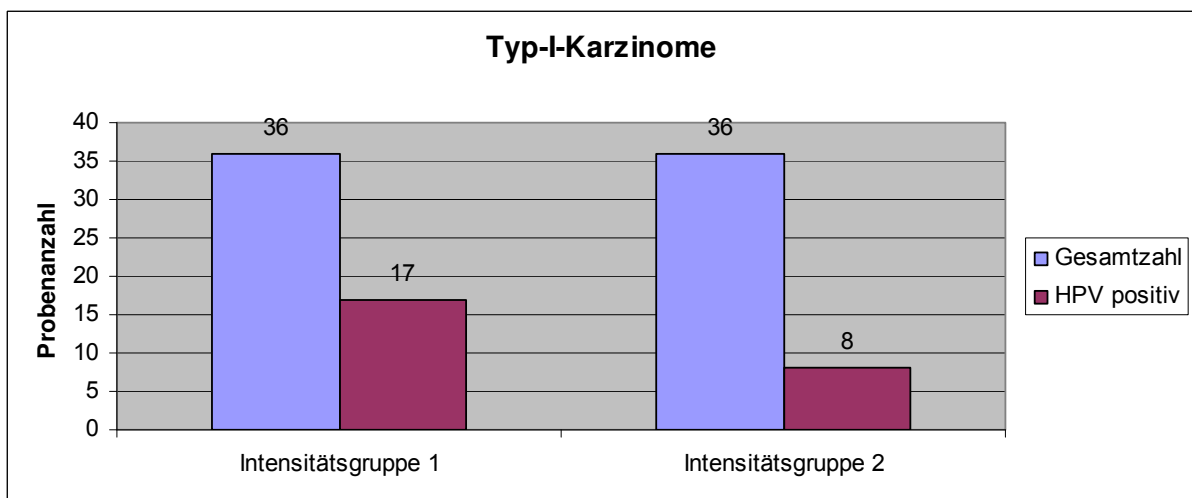
**Diagramm 2:** Endometrioide Adenokarzinome - unterteilt in zwei Intensitätsgruppen. Bei Intensitätsgruppe 1 wurde der Cut off bei  $IRS \geq 1$  gewählt, bei Intensitätsgruppe 2 entsprechend bei  $IRS \geq 2$ . Somit ergeben sich 10 bzw. 4 HPV positive Karzinomproben in der Gruppe der endometrioiden Adenokarzinome. Dies entspricht 41,7 bzw. 16,7 %.



**Diagramm 3:** Adenosquamöse Karzinome - unterteilt in zwei Intensitätsgruppen. Bei Intensitätsgruppe 1 wurde der Cut off bei  $IRS \geq 1$  gewählt, bei Intensitätsgruppe 2 entsprechend bei  $IRS \geq 2$ . Somit ergeben sich 5 bzw. 3 HPV positive Karzinomproben in der Gruppe der adenosquamösen Karzinome. Dies entspricht 62,5 bzw. 37,5 %.



**Diagramm 4:** Muzinöse Karzinome - unterteilt in zwei Intensitätsgruppen. Bei Intensitätsgruppe 1 wurde der Cut off bei  $IRS \geq 1$  gewählt, bei Intensitätsgruppe 2 entsprechend bei  $IRS \geq 2$ . Somit ergeben sich 2 bzw. 1 HPV positive Karzinomproben in der Gruppe der muzinösen Karzinome. Dies entspricht 50 bzw. 25 %.



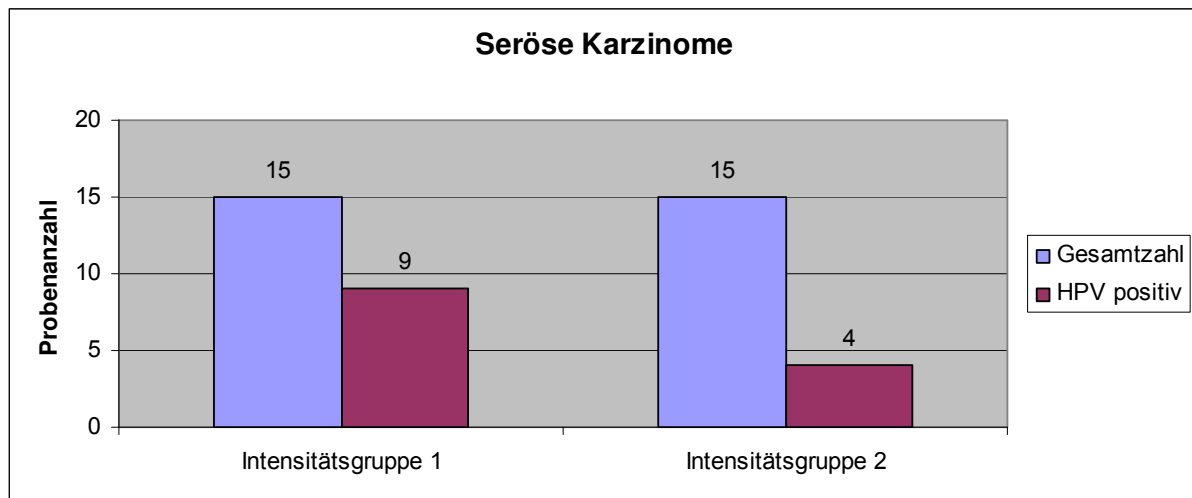
**Diagramm 5:** Typ-I-Karzinome - unterteilt in zwei Intensitätsgruppen. Bei Intensitätsgruppe 1 wurde der Cut off bei  $IRS \geq 1$  gewählt, bei Intensitätsgruppe 2 entsprechend bei  $IRS \geq 2$ . Somit ergeben sich 17 bzw. 8 HPV positive Karzinomproben in der Gruppe der Typ-I-Karzinome. Dies entspricht 47,2 bzw. 22,2 %.

Bei der Auswertung der Typ-II-Karzinome zeigten sich folgende Ergebnisse: 9 (60%) bzw. 4 (26,7%) der 15 serösen Karzinome wiesen eine positive Hybridisierungs-Reaktion auf. 2 der Proben waren mit IRS-Werten von 4/12 und 6/12 dabei deutlich HPV positiv (s. Diagramm 6).

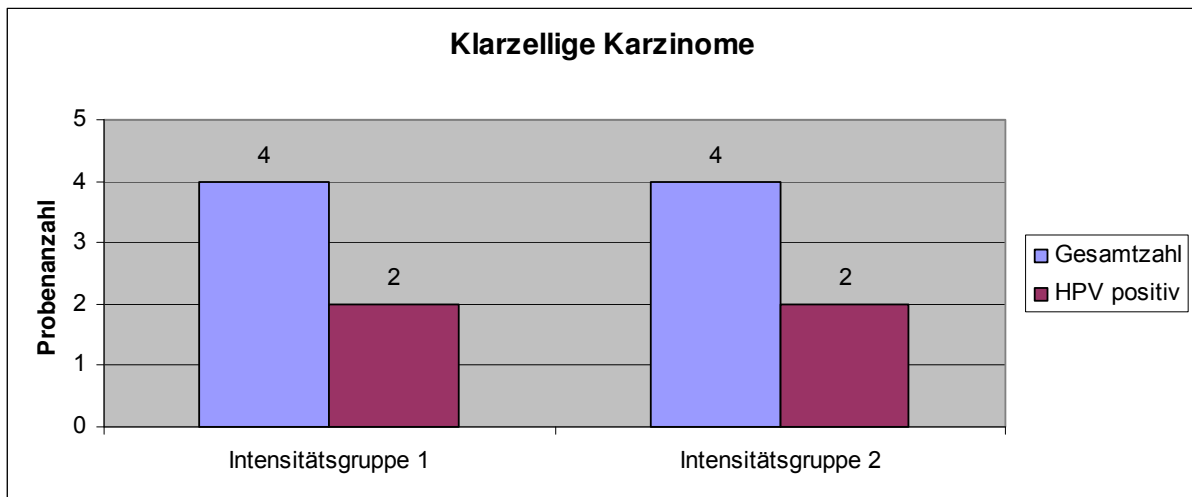
Bei den 4 klarzelligen analysierten Karzinomen wurde bei 2 (50%) Proben HPV nachgewiesen (s. Diagramm 7).

Eine starke Färbereaktion wurde bei 3 (75%) von 4 undifferenzierten Karzinomen beobachtet, wobei sich bei einer Probe sogar ein IRS-Wert von 12/12 ergab (s. Diagramm 8).

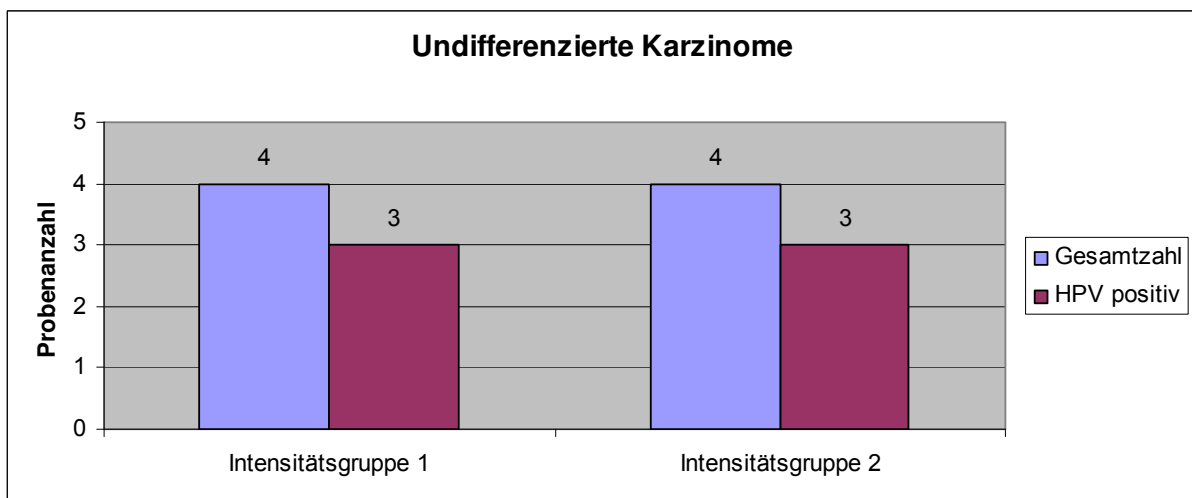
Insgesamt gesehen zeigte sich bei den 23 Typ-II-Karzinomen in 14 (60,9%) bzw. 9 (39,1%) Fällen eine positive Hybridisierungs-Reaktion (s. Diagramm 9). Wobei im Vergleich zu den Typ-I-Karzinomen die Intensität der Färbereaktion mehrfach deutlich stärker ausfiel.



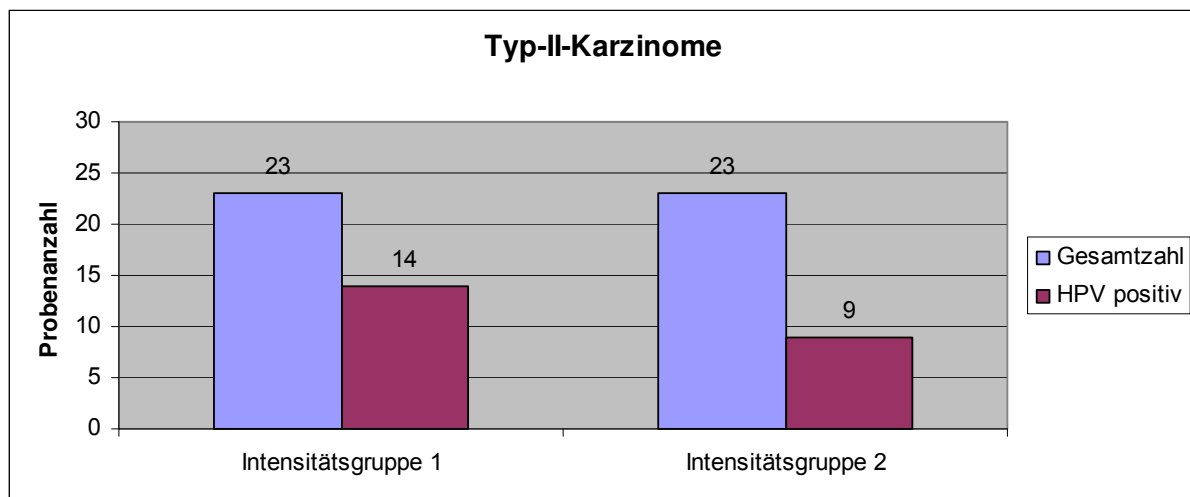
**Diagramm 6:** Seröse Karzinome - unterteilt in zwei Intensitätsgruppen. Bei Intensitätsgruppe 1 wurde der Cut off bei  $IRS \geq 1$  gewählt, bei Intensitätsgruppe 2 entsprechend bei  $IRS \geq 2$ . Somit ergeben sich 9 bzw. 4 HPV positive Karzinomproben in der Gruppe der serösen Karzinome. Dies entspricht 60 bzw. 26,7 %.



**Diagramm 7:** Klarzellige Karzinome - unterteilt in zwei Intensitätsgruppen. Bei Intensitätsgruppe 1 wurde der Cut off bei  $\text{IRS} \geq 1$  gewählt, bei Intensitätsgruppe 2 entsprechend bei  $\text{IRS} \geq 2$ . Somit ergeben sich je 2 HPV positive Karzinomproben in der Gruppe der klarzelligen Karzinome. Dies entspricht je 50 %.



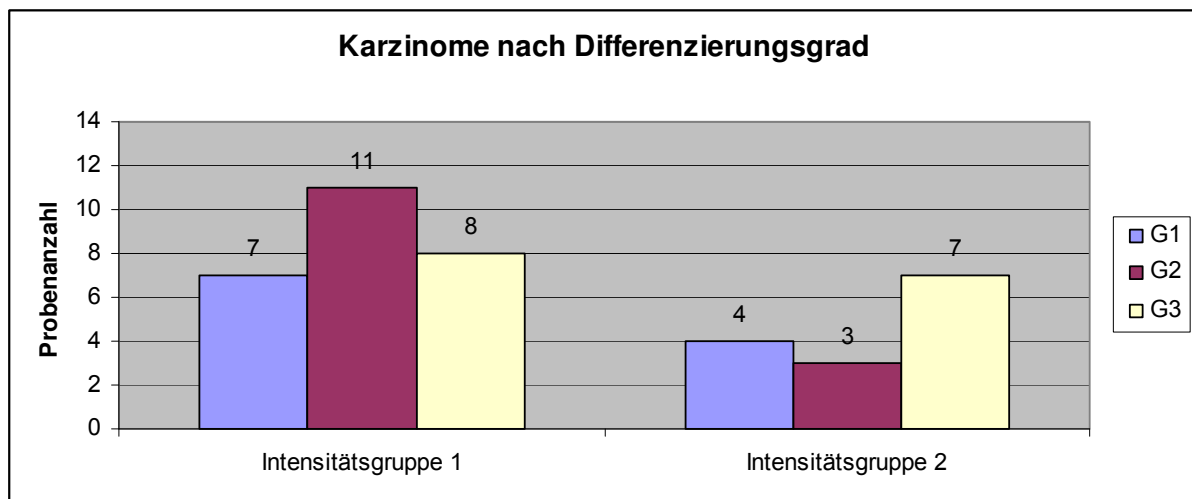
**Diagramm 8:** Undifferenzierte Karzinome - unterteilt in zwei Intensitätsgruppen. Bei Intensitätsgruppe 1 wurde der Cut off bei  $\text{IRS} \geq 1$  gewählt, bei Intensitätsgruppe 2 entsprechend bei  $\text{IRS} \geq 2$ . Somit ergeben sich je 3 HPV positive Karzinomproben in der Gruppe der undifferenzierten Karzinome. Dies entspricht je 75 %.



**Diagramm 9:** Typ-II-Karzinome - unterteilt in zwei Intensitätsgruppen. Bei Intensitätsgruppe 1 wurde der Cut off bei  $\text{IRS} \geq 1$  gewählt, bei Intensitätsgruppe 2 entsprechend bei  $\text{IRS} \geq 2$ . Somit ergeben sich 16 bzw. 10 HPV positive Karzinomproben in der Gruppe der Typ-II-Karzinome. Dies entspricht 60,9 bzw. 39,1 %.

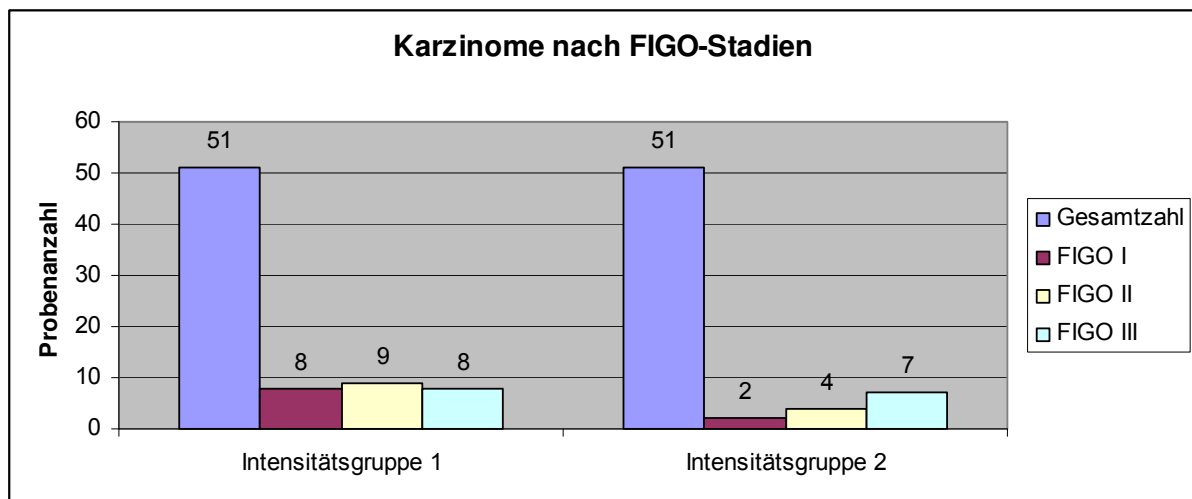
Eine Bilderauswahl zu einzelnen positiven immunhistochemischen Reaktionen an verschiedenen histologischen Subtypen des Endometriumkarzinoms ist im Anhang der Arbeit aufgeführt (s. Abb. 7a-h).

Die Auswertung der positiven immunhistochemischen Reaktion in Bezug auf HPV hinsichtlich der Tumorggraduierung ergab folgende Ergebnisse (s. Diagramm 10): Alle Proben zusammen betrachtet, ist mit je 20 G1- und G2-Tumore bzw. 18 G3-Tumore die Probenverteilung auf die unterschiedlichen Differenzierungsstufen relativ homogen. Bezogen auf den positiven HPV-Nachweis zeigte sich jedoch eine deutliche Tendenz bei den G3- Karzinomen mit 8 bzw. 7 positiven Proben von insgesamt 18. Die G2-Karzinome zeigten mit 11 von 20 Proben zunächst ein sehr starkes Ergebnis. Nach Abzug der nur schwach positiven Proben verbleiben jedoch nur 3 positive HPV-DNA-Nachweise. Ähnliches ergibt sich bei den G1-Tumoren mit 7 bzw. 4 positiven Proben.



**Diagramm 10:** Karzinome nach Differenzierungsgrad - unterteilt in zwei Intensitätsgruppen. Bei Intensitätsgruppe 1 wurde der Cut off bei  $IRS \geq 1$  gewählt, bei Intensitätsgruppe 2 entsprechend bei  $IRS \geq 2$ . Somit ergeben sich 7, 11 und 8 bzw. 4, 3 und 7 HPV positive Karzinomproben, wenn man die Gesamtzahl der untersuchten Karzinome nach ihrem Differenzierungsgrad aufschlüsselt.

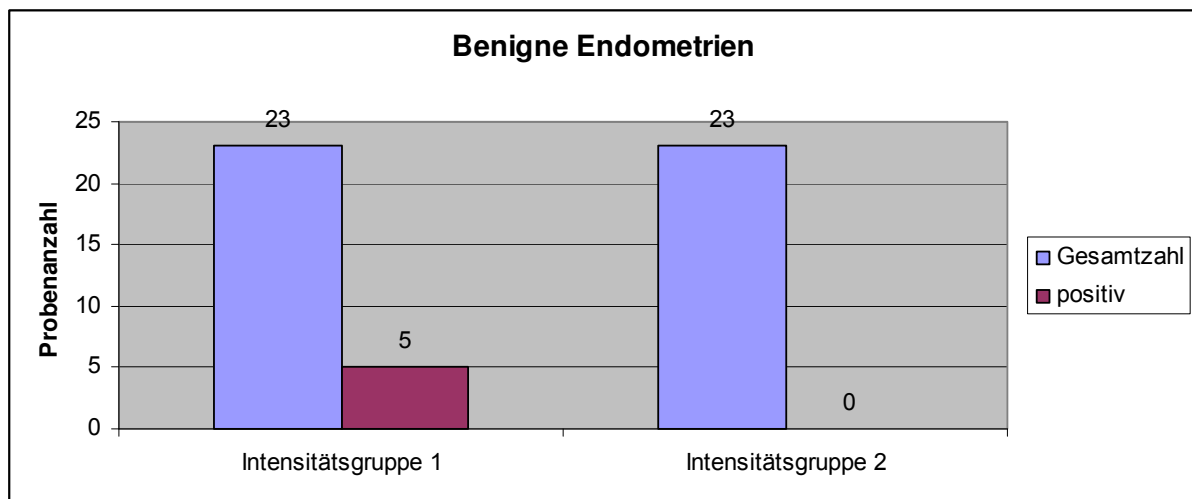
Von den 51 Proben mit vorliegendem FIGO-Stadium verteilten sich je 17 Proben gleichmäßig auf das FIGO-I-, II- und III-Stadium. Wie bereits oben erwähnt, lag bei keinem Karzinom ein FIGO-IV-Stadium vor. Auch hier zeigten sich wiederum die deutlichsten positiven Ergebnisse in den fortgeschritteneren Stadien: Mit 8 (47%) bzw. 7 (41,2%) positiven Proben lag bei den Karzinomen mit einem diagnostizierten FIGO-III-Stadium die deutlichsten Reaktionen vor. Bei den früheren Stadien (FIGO I und II) war mit 8 bzw. 9 positiven Proben zunächst auch eine relativ häufige positive Färbereaktion nachweisbar. Betrachtete man jedoch nur die stärker angefärbten Proben, verblieben 2 bzw. 4 positive Ergebnisse (s. Diagramm 11).



**Diagramm 11:** Karzinome nach FIGO-Stadien - unterteilt in zwei Intensitätsgruppen. Bei Intensitätsgruppe 1 wurde der Cut off bei  $\text{IRS} \geq 1$  gewählt, bei Intensitätsgruppe 2 entsprechend bei  $\text{IRS} \geq 2$ . Somit ergeben sich 8, 9 und 8 bzw. 2, 4 und 7 HPV positive Karzinomproben, wenn man die Gesamtzahl der untersuchten Karzinome nach ihrem FIGO-Stadium aufschlüsselt.

#### 4.3.3 HPV in normalem Endometriumgewebe

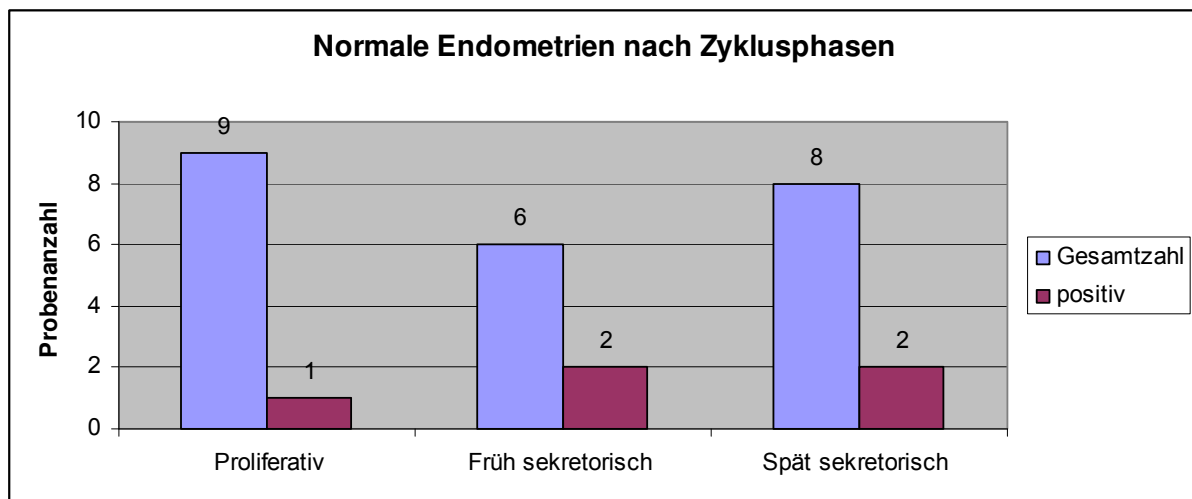
Neben den Karzinomen wurden weitere 23 Proben von normalem Endometriumgewebe untersucht. Unter Einbezug des IRS-Wertes von 1/12 ergab sich bei 5 Proben (21,7%) eine positive Immunreaktion. Berücksichtigte man diesen Wert jedoch nicht, konnte keine Probe als HPV-positiv gewertet werden (s. Diagramm 12 und Abb. 11a-d).



**Diagramm 12:** Benigne Endometrien - unterteilt in zwei Intensitätsgruppen. Bei Intensitätsgruppe 1 wurde der Cut off bei  $IRS \geq 1$  gewählt, bei Intensitätsgruppe 2 entsprechend bei  $IRS \geq 2$ . Somit ergeben sich 5 bzw. 0 HPV positive Karzinomproben in der Gruppe der benignen Endometrien. Dies entspricht 21,7 bzw. 0 %.

Eine Aufgliederung der Endometriumproben nach Gesichtspunkten der Zyklusphasen zeigte folgende Verteilung (s. Diagramm 13): 1 (11,1%) positive Probe in proliferativem Endometrium und je 2 in früh (33,3%) bzw. spät (25,0%) sekretorischem Endometrium. Auch auf Grund der geringen Anzahl positiver Proben ließ sich kein Expressionsmuster in Bezug auf die Zyklusphasen ausmachen.





**Diagramm 13:** Normale Endometrien nach Zyklusphasen – hierbei ergeben sich 1 positiver HPV-Nachweis in der proliferativen Zyklusphase und je 2 positive Proben in der Gruppe der früh bzw. spät sekretorischen Zyklusphase. Dies entspricht 11,1 bzw. 33,3 und 25 %.

#### 4.4 HPV-Nachweis mittels PCR

Die HPV-16-E6-PCR wurde mit den drei verschiedenen HPV-positiven Zelllinien (Zervixkarzinom-Zellreihen) durchgeführt. Wie zu erwarten war, zeigten die beiden HPV-16-positiven-Zelllinien (SiHa und CaSki) ein deutliches PCR Signal, wohingegen kein Signal in den HPV-18-positiven-HeLa-Zellen sichtbar wurde. Es wurden keine falsch positiven Testergebnisse bei den Negativkontrollen, bestehend aus normalem Zervixgewebe, Hirngewebe und reinem Wasser, festgestellt. Interessanterweise kam es jedoch zu keinem positiven PCR-Signal bei einer aus einem Plattenepithelkarzinom der Zervix entnommener DNA, welches durch die HPV-ISH positiv getestet wurde und in welchem HPV 16 statistisch gesehen in über 50% aller Fälle vorkommt.



**Abb. 6:** Nachweis der E6 Sequenz von HPV-16-DNA in Zervixkarzinom-Zelllinien durch PCR. Von links nach rechts: Negativkontrolle ohne DNA, CaSki, SiHa, HeLa, Zervixkarzinom, Zervix, Hirn, Aqua dest.

## 5 Diskussion

Das Endometriumkarzinom ist der häufigste Tumor der weiblichen Geschlechtsorgane in den Industrienationen [2, 40]. Faktoren, die mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Endometriumkarzinoms verbunden sind, wie zum Beispiel eine übermäßige Östrogenbelastung, wurden bereits erläutert. Für die Hypothese, dass auch Viren eine Rolle in der Karzinogenese spielen, gibt es bisher nur wenige Anhaltspunkte. Im Gegensatz dazu ist der Zusammenhang einer High-risk-HPV-Infektion bei der Entstehung anderer Malignome, allen voran des Zervixkarzinoms, zweifelsfrei anerkannt [86].

Um zu untersuchen, ob der HPV-Infektion auch bei der Entstehung des Endometriumkarzinoms eine Bedeutung zukommt, wurden in der vorliegenden Arbeit Endometriumkarzinomproben verschiedener Histologien mittels ISH auf das Vorhandensein von HPV im Vergleich zu Normalgewebe untersucht. Die Grundüberlegung dieser Versuchsreihe war, dass bestimmte humane Papillomaviren in Adenokarzinomen der Zervix nachweisbar sind, HPV somit auch mit der Karzinogenese des Endometriums, welches anatomisch und histologisch mit dem endozervikalem Epithel verwandt ist, assoziiert sein könnte. Dagegen spricht jedoch die Annahme, dass HPV zwar in Adenokarzinomen des Anus nicht jedoch des Kolons eine Rolle spielt [14]. Zahlreiche Autoren haben sich bereits mit dem Thema HPV-Infektion und Endometriumkarzinom beschäftigt. Deren Studien ergaben in Bezug auf den Zusammenhang einer HPV-Infektion und der Entstehung des Endometriumkarzinoms jedoch widersprüchliche Ergebnisse.

### **5.1 In-situ-Hybridisierung als geeignete Nachweismethode**

Es herrscht eine ständige Diskussion darüber, welche Methode zum Nachweis von HPV-DNA in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe die Geeignetste sei. Die PCR-Technik stellt wohl die sensitivste Methode dar, da ihr der Nachweis sogar ab nur einer HPV-DNA-Kopie pro Zelle gelingt [15, 91]. Der größte Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass der morphologische Kontext durch die DNA-Extraktion verloren geht. Dieser ist allerdings für die histopathologische Interpretation nötig, um, wie in dieser Arbeit geschehen, durch den IR-Score eine abgestufte Beurteilung der positiven immunhistochemischen Reaktion durchzuführen. Diesem Problem könnte man durch die Anwendung einer In-situ-PCR entgehen, welche jedoch ein äußerst kompliziertes Verfahren darstellt, das speziell geschultes Laborpersonal erfordert und zudem für ein Routineverfahren zu kostspielig ist [89].

Im Gegensatz dazu bietet die In-situ-Hybridisierung ein Verfahren, mit dem ein präzise im Gewebe lokalisierbarer HPV-DNA-Nachweis gelingt, ohne die ursprüngliche Morphologie zu zerstören [33, 85]. Neben der Möglichkeit zur Lokalisierung der HPV-DNA verringert die Methode der ISH auch die beim PCR-Verfahren mögliche Kontamination der Probe z. B. durch angrenzendes HPV-positives Zervixgewebe [24].

Die Visualisierung einer HPV-Infektion könnte auch mittels Immunhistochemie gelingen, eine einfache, wenig fehleranfällige Methode. Allerdings können nur aktive Infektionen auf der Basis von Proteinen nachgewiesen werden, was die Sensitivität dieser Methode stark einschränkt [19].

Somit ist die ISH eine wichtige geeignete Methode zum Nachweis von HPV-DNA, gerade wenn eine Lokalisation der Infektion analysiert werden soll. Hier ist außerdem die Unterscheidung zwischen episomaler DNA von integrierter DNA möglich, was einen Schluss auf den Infektionsstatus erlaubt [85]. Auf der anderen Seite zeigte die ISH bei der Untersuchung von Zellproben ein Detektionslimit von 10-50 DNA-Kopien pro Zelle, was ein Problem darstellen könnte bei der Untersuchung von Karzinomen mit einer geringeren HPV-DNA-Belastung. Jedoch kann man annehmen, dass das Detektionslimit eher bei 10 als bei 50 DNA-Kopien pro Zelle liegt. Im Rahmen des Vergleiches der beiden ISH-Methoden zu Beginn dieser Arbeit gelang nämlich ein 100 bzw. 90%-iger Nachweis von HPV-DNA in den 10 Zervixkarzinomproben, obwohl laut Birner et al.[5] ein hoher Anteil dieser Karzinome weniger als 50 HPV DNA Kopien pro Zelle hat.

Bei der Gegenüberstellung der beiden Kits von Dako bzw. Zytomed ergab sich ein leicht besseres Ergebnis des GenPoint™ Systems von Dako. Zum einen gelang diesem Verfahren in 10 von 10 Zervixkarzinomproben der HPV-Nachweis im Gegensatz zu 9 von 10 mit dem Zytofast HPV Screening Kit von Zytomed. Dies könnte an der möglichen nachzuweisenden Anzahl von HPV-Typen durch die beiden verschiedenen Kits liegen. Beide Kits arbeiten mit biotinylierten Sonden, wobei das System von Dako 13 High-Risk-HPV-Typen nachweisen kann, der Kit von Zytomed nur 5 HPV-Typen. Während die 13 High-Risk-Typen für 93,6% aller Zervixkarzinome verantwortlich gemacht werden, verursachen die 5 untersuchten HPV-Typen von Zytofast nur 77,6% aller Zervixkarzinome [54]. Zum anderen ist auf Grund des besseren Farbkontrastes der braunen Färbung durch DAB auf blauem Hintergrund bei Dako das Testergebnis leichter zu interpretieren. Der entscheidende Vorteil liegt jedoch in dem von Dako verwendeten Amplifikationssystem, wodurch wohl ein deutlicheres Signal eines positiven HPV-DNA-Nachweises erzeugt wird und aus diesem Grund auch für die weitere Probenanalyse in dieser Arbeit bevorzugt wurde.

## **5.2 Nachweis von HPV in den verschiedenen Endometriumkarzinomen**

Die vorliegende Arbeit zeigte unter Verwendung der stringenteren Intensitätsgruppe 2 des IRS in 17 von 59 Karzinomproben (28,8%) einen positiven HPV-Nachweis, was im Kontrast zu den 0% in den Normalgeweben einen deutlichen Hinweis darauf gibt, dass HPV in der Karzinogenese des Endometriumkarzinoms eine Rolle spielen könnte. Es konnte sowohl bei den Typ-I, als auch bei den Typ-II-Karzinomen HPV-DNA nachgewiesen werden. Jedoch lag die Anzahl der positiven Reaktionen bei den Typ-II-Karzinomen mit 39,1% (9/23 Gewebeproben) deutlich höher als bei den Typ-I-Karzinomen mit 22,2% (8/36 Gewebeproben). Zudem fiel bei den Typ-II-Karzinomen der Nachweis der HPV-DNA meist wesentlich stärker aus.

Wie zuvor beschrieben, beeinflusst HPV die Funktion des Tumorsuppressorgens p53. Bei 90% aller Typ-II-Karzinome liegt jedoch schon eine Mutation dieses Genes vor, weshalb es nicht logisch erscheint, dass bei diesen Karzinomen ein vermehrter Nachweis von HPV erzielt werden konnte. In Zervixkarzinomen beispielsweise ersetzt die Interaktion des E6 HPV-Gens mit dem p53-Wildtyp den Bedarf für eine Mutation von TP53 [80]. In Studien bestätigte sich ein inverser Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von HPV-DNA in Zervixkarzinomen und einer p53-Überexpression [34]. Diese Beobachtung gilt sowohl für Plattenepithel- wie auch für Adenokarzinome der Zervix [84].

Warum in dieser Gruppe, zu denen die serösen, klarzelligen sowie die undifferenzierten Karzinome gezählt werden, das Ergebnis deutlicher ausfällt und welche Bedeutung dies hat, bleibt Aufgabe weiterer Studien.

Betrachtet man die einzelnen histologischen Gruppen voneinander getrennt, zeigt die Gruppe der undifferenzierten Karzinome mit 75% (3/4 Proben) das deutlichste Ergebnis. Gefolgt wird dieses Ergebnis von 50% (2/4 Proben) bei den klarzelligen Karzinomen, ebenfalls eine Untergruppe der Typ-II-Karzinome. Die Aussagekraft bleibt jedoch auf Grund der geringen Probenanzahl in beiden Gruppen eingeschränkt.

Ein aussagekräftigeres und in Bezug auf den HPV-Nachweis immer noch sehr deutliches Ergebnis zeigt sich mit 37,5% (3/8 Karzinomen) bei den adenosquamösen Endometriumkarzinomen. Da der sichere Zusammenhang zwischen einer HPV-Infektion

und der Karzinomentstehung vor allem bei Malignomen mit einem squamösen Oberflächenepithel (Zervix, Vulva, Penis) bestätigt ist, ist dieses Ergebnis nicht verwunderlich. Eine Studie von Gingelmaier et al.[29] untersuchte ebenfalls 8 adeno-squamöse Endometriumkarzinome immunhistochemisch mittels spezifischer monoklonaler Antikörper gegen HPV. Dabei konnte in allen 8 Proben HPV 18 nachgewiesen werden. Dahingegen konnten Czerwenka et al.[14] in ihrer Studie keinen Anhalt für einen Zusammenhang zwischen einer HPV-Infektion und dem endometrioiden Endometriumkarzinom mit squamösen Anteilen finden.

Typische histologische Veränderungen in Epithelzellen auf Grund einer HPV-Infektion wie Multinuklearität und Koilozytosis konnten bisher ebenfalls nur in den Plattenepithelkomponenten einiger Endometriumkarzinome nachgewiesen werden [42, 59]. So zeigte auch eine Studie von Brewster et al.[7] in nur 2 der durch PCR untersuchten 66 Endometriumkarzinomproben einen positiven HPV-DNA-Nachweis, wobei beide positiv getesteten Proben maligne Plattenepithelanteile (adenosquamöses bzw. squamöses Karzinom) enthielten.

Auch wenn nur ein geringer Teil aller Endometriumkarzinome maligne Plattenepithelkomponenten enthält [7], ist das Ergebnis dieser Arbeit ein starker Hinweis darauf, dass die Karzinogenese dieser Tumore mit einer HPV-Infektion assoziiert sein könnte. Es bleibt zu klären, in welchem Maße und an welcher Stelle HPV in der Karzinogenese dieser Karzinome eine Rolle spielt.

In der Gruppe der endometrioiden Adenokarzinome konnten 16,7% (4/24 Proben), bei den muzinösen 25% (1/4 Proben) und bei den serösen 26,7% (4/15 Proben) positiv auf HPV getestet werden. Diese Zahlen sind gerade im Vergleich zu den 0% Vorkommen bei den Normalgeweben ebenfalls nicht zu vernachlässigen, fallen jedoch geringer aus, als die Ergebnisse der anderen Untergruppen.

Ähnliche Ergebnisse im Bereich der endometrioiden Endometriumkarzinome erzielte eine Studie von Giatromanolaki et al. [27]. Bei dieser konnten in 24 bzw. 20% der untersuchten endometrioiden Endometriumkarzinome HPV 16 bzw. 18 mittels PCR nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich in keinem dieser Fälle ein zellulärer Beweis für eine HPV-Infektion. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass auch in Adenokarzinomen der Zervix der morphologische Nachweis einer HPV-Infektion fehlen

kann [23]. Erstaunlicherweise gab es bei dieser Studie keine Korrelation zwischen dem Vorkommen von HPV 16 bzw. 18 und der squamösen Epitheldifferenzierung.

Ebenso fanden Fujita et al.[24] bei der Untersuchung endometrioider Endometriumkarzinome mittels E6 und L1 HPV 16 PCR zusammen in 20 von 85 (23,5%) analysierten Proben HPV-DNA. Kein signifikanter Zusammenhang ergab sich dabei zwischen dem Virusnachweis und dem Grading des Tumors.

Ein Case Report [30], der sich mit dem Vorkommen von HPV-DNA in muzinösen Endometriumkarzinomen beschäftigte, zeigte in keiner der zwei untersuchten Proben ein positives PCR-Signal. Da dieser Subtyp jedoch äußerst selten vorkommt und bisher nur von wenigen Autoren beschrieben wurde, ist ein Fazit bezüglich der Assoziation mit HPV schwierig.

Bezogen auf das Grading der Tumore zeigte sich eine deutliche positive immunhistochemische Reaktion bei den wenig differenzierten G3-Tumoren. Dies könnte darauf deuten, dass eine HPV-Infektion vor allem bei den Karzinomen vorkommt, welche eine schlechtere Differenzierung aufweisen und somit eine schlechtere Prognose. Ähnliches ergab sich bei der Betrachtung der FIGO-Stadien. Hier zeigte sich auch gerade bei den fortgeschritteneren Karzinomen ein deutlicher HPV-Nachweis.

Das Auffinden von HPV-DNA in malignem Endometriumgewebe ist nicht selten, jedoch bleibt seine genaue biologische Bedeutung noch ungeklärt, ebenso, ob HPV in diesen Fällen auch zur malignen Entartung des Gewebes beiträgt. Durch die Methode der ISH konnte die Möglichkeit der Kontamination ausgehend von Zervixgewebe oder von umgebendem nicht tumoralem Gewebe minimiert werden. Die Annahme, dass es sich beim Nachweis von HPV-DNA von Endometriumgewebe nur um eine zufällige Beobachtung ohne jegliche Bedeutung für die Karzinogenese handelt [27], ist zweifelhaft. In dieser Arbeit zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Nachweis von HPV zwischen normalem Endometriumgewebe und Endometriumkarzinomen. Während in keinem der Normalgewebe HPV-DNA bestätigt werden konnte, zeigten 28,8% aller Endometriumkarzinome eine positive Farbreaktion. Nicht unbeachtet lassen darf man die Tatsache, dass es sich bei den Normalgeweben im Gegensatz zu den Proben der analysierten Karzinome flächenmäßig meist um nur sehr kleine Gewebeproben handelte. Auch dies könnte dazu beigetragen haben, dass sich bei den Normalgeweben kein Nachweis von HPV-DNA zeigte.

Dennoch bleibt es bei der Beobachtung eines deutlich höheren HPV-Nachweises in Typ-II-Endometriumkarzinomen verglichen mit Typ-I-Tumoren. Ob dies zu der höheren Aggressivität dieser Tumoren beiträgt ist nicht Bestandteil dieser Arbeit und sollte durch weitere Studien geklärt werden.

### **5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Am Anfang dieser Arbeit stand zunächst die Methodenauswahl zur Detektion von HPV in Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebetteten Gewebe. Aufgrund der Anwenderfreundlichkeit der ISH bei gleichzeitig guter histopathologischer Interpretationsmöglichkeit durch Beibehaltung des morphologischen Kontextes, fiel die Entscheidung zu Gunsten der ISH aus. Die Sensitivität dieser Methode konnte durch Zellreihen mit einem definierten HPV-DNA-Gehalt nachgewiesen werden. Um innerhalb der ISH einen geeigneten Versuchsaufbau mit guter Auswertbarkeit zu erreichen wurden zudem zwei Assays unterschiedlicher Hersteller miteinander verglichen. Zum einen der Kit Gen-Point™ der Firma Dako, zum anderen das Verfahren der Chromogenen ISH mit Zytotest® der Firma Zytomed. Die Testergebnisse wurden an Zervixkarzinomproben durchgeführt und zeigten einen etwas positiver ausfallenden Nachweis von HPV-DNA durch den Kit der Firma Dako.

Die Auswertung aller 59 untersuchten Endometriumkarzinomproben anhand des IR-Scores ergab bei 52,5% (Intensitätsgruppe 1) bzw. 28,8% (Intensitätsgruppe 2) einen positiven HPV-Nachweis. Dies bedeutet, dass bei mehr als jeder 4. Endometriumkarzinomprobe ein Nachweis von HPV-DNA im Gewebe gelang und somit der Zusammenhang dieses Virus mit der Entstehung und/oder Prognose des Endometriumkarzinoms dringend Fragestellung weiterer Arbeiten sein sollte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Nachweis von HPV-DNA auch in Bezug auf die verschiedenen histologischen Subtypen des Endometriumkarzinoms analysiert. Hierbei ergab sich bei den adenosquamosen Karzinomen mit 62,5 bzw. 37,5% die am deutlichsten ausfallende positive immunhistochemische Reaktion.

Die Endometriumkarzinome werden in zwei Untergruppen unterteilt. Die Typ-II-Karzinome, zu denen die serösen, die klarzelligen und die undifferenzierten Endometriumkarzinome zählen, zeichnen sich meist durch eine schlechtere Prognose und



High-Grade-Differenzierung aus. In dieser Gruppe gelang in dieser Arbeit auch ein wesentlich deutlicher und intensiver ausfallender HPV-DNA-Nachweis mit 60,9 bzw. 39,1% und IRS-Werten von bis zu 12/12. In der Gruppe der Typ-I-Karzinome, welche sich aus den endometrioiden, den adenosquamösen und den muzinösen Endometriumkarzinomen zusammensetzt, fiel das Ergebnis mit 47,2 bzw. 22,2% immer noch stark, wenn auch deutlich geringer aus. Dies scheint ein interessanter Anhaltspunkt für weitere Analysen zu sein.

Zu der Erkenntnis, dass HPV vor allem bei den Typ-II-Karzinomen nachgewiesen werden konnte, reiht sich das Ergebnis ein, welches sich aus der Auswertung der Endometriumkarzinome nach ihrem Differenzierungsgrad ergibt. Hierbei gelang nämlich in 8 bzw. 7 von 18 G3-Tumoren ein positiver HPV-DNA-Nachweis. Dies könnte vermuten lassen, dass HPV bei Endometriumkarzinomen für eine geringe Entdifferenzierung und somit schlechtere Prognose verantwortlich ist.

Gerade weil die nicht endometrioiden und schlecht differenzierten High-Grade - Adenokarzinome eine hohe Mortalität- und Rezidivrate aufweisen, sollte der in diesen Gruppen deutlich höher ausgefallene HPV-Nachweis zur Verbesserung der Überlebensrate betroffener Frauen dringend Inhalt weiterer Studien sein.

Um die Aussagekraft der oben genannten Ergebnisse zu stützen wurden ergänzend auch normale Endometriumproben mit dem gleichen ISH-Verfahren untersucht. In der Intensitätsgruppe 2 (entsprechend einem IRS-Wert  $\geq 2$ ) zeigte sich bei keiner einzigen Probe eine positive immunhistochemische Reaktion in Bezug auf den Nachweis von HPV-DNA. Dementsprechend dürfen die positiven HPV-DNA-Nachweise in den Karzinomproben als von besonderer Wichtigkeit für die weitere Forschung gewertet werden.

## 6 Zusammenfassung

Die In-situ-Hybridisierung ist eine ideale Methode zum Nachweis von HPV-DNA in Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebetteten Gewebe. Bei sehr guter Sensitivität bietet diese Methode gleichzeitig den morphologischen Kontext für eine aussagekräftige Interpretation des Virusnachweises sowie des Infektionsstatus.

Bei den beiden gegenübergestellten ISH-Kits schnitt das System von Dako etwas besser ab. Begründet wird dies durch die bessere Farbkontrastdarstellung, welche durch das von Dako verwendete Amplifikationssystem erreicht wird. Zudem überzeugt Dako durch die höhere Anzahl von möglichen nachzuweisenden HPV-Typen im Gegensatz zum Kit von Zytomed.

Der Nachweis von HPV-DNA in knapp 30% aller Karzinomproben im Gegensatz zu 0% in den Normalgeweben verdeutlicht, dass der Zusammenhang zwischen einer HPV-Infektion und dem Endometriumkarzinom nicht länger vernachlässigt werden sollte. Welche Bedeutung HPV in der Entstehung des Endometriumkarzinoms hat und an welcher Stelle der Karzinogenese HPV eine Rolle spielt, bleibt Fragestellung weiterer Studien.

Bezüglich der histologischen Subtypen des Endometriumkarzinoms zeigten die adenosquamösen Karzinome die aussagekräftigsten positiven immunhistochemischen Reaktionen in Bezug auf HPV. Gerade in Anbetracht der bereits gut erforschten Zusammenhänge zwischen einer HPV-Infektion und der Entstehung von Malignomen mit squamöser Oberflächenepithel ist dieses Ergebnis von besonderem Interesse.

Im Vergleich zu den Typ-I-Karzinomen zeigten die Typ-II-Karzinome zusammengekommen eine wesentlich deutlichere positive immunhistochemische Reaktion. Ob eine HPV-Infektion für die grundsätzlich schlechtere Prognose der Typ-II-Karzinome verantwortlich ist und ob damit ein Risikofaktor, der therapeutisch angegangen werden könnte, identifiziert wurde, sollte ebenfalls Inhalt weiterer Forschung sein.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Acharya, S., et al., *Rare uterine cancers*. Lancet Oncol, 2005. **6**(12): p. 961-71.
2. Amant, F., et al., *Endometrial cancer*. Lancet, 2005. **366**(9484): p. 491-505.
3. Baseman, J.G. and L.A. Koutsky, *The epidemiology of human papillomavirus infections*. J Clin Virol, 2005. **32 Suppl 1**: p. S16-24.
4. Bergeron, C., et al., *Search for human papillomaviruses in normal, hyperplastic, and neoplastic endometria*. Obstet Gynecol, 1988. **72**(3 Pt 1): p. 383-7.
5. Birner, P., et al., *Signal-amplified colorimetric in situ hybridization for assessment of human papillomavirus infection in cervical lesions*. Mod Pathol, 2001. **14**(7): p. 702-9.
6. Bokhman, J.V., *Two pathogenetic types of endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 1983. **15**(1): p. 10-7.
7. Brewster, W.R., et al., *Does human papillomavirus have a role in cancers of the uterine corpus?* Gynecol Oncol, 1999. **75**(1): p. 51-4.
8. Calle, E.E., et al., *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*. N Engl J Med, 2003. **348**(17): p. 1625-38.
9. Clark, M.A., A. Hartley, and J.I. Geh, *Cancer of the anal canal*. Lancet Oncol, 2004. **5**(3): p. 149-57.
10. Clarke, B.A. and C.B. Gilks, *Endometrial carcinoma: controversies in histopathological assessment of grade and tumour cell type*. J Clin Pathol, 2010. **63**(5): p. 410-5.
11. Clement, P.B. and R.H. Young, *Non-endometrioid carcinomas of the uterine corpus: a review of their pathology with emphasis on recent advances and problematic aspects*. Adv Anat Pathol, 2004. **11**(3): p. 117-42.
12. Crawford, L.V. and E.M. Crawford, *A Comparative Study of Polyoma and Papilloma Viruses*. Virology, 1963. **21**: p. 258-63.
13. Creasman, W., *Revised FIGO staging for carcinoma of the endometrium*. Int J Gynaecol Obstet, 2009. **105**(2): p. 109.
14. Czerwenka, K., et al., *Human papillomavirus detection of endometrioid carcinoma with squamous differentiation of the uterine corpus*. Gynecol Oncol, 1996. **61**(2): p. 210-4.
15. Dabic, M.M., et al., *Comparison of polymerase chain reaction and catalyzed signal amplification in situ hybridization methods for human papillomavirus detection in paraffin-embedded cervical preneoplastic and neoplastic lesions*. Arch Med Res, 2004. **35**(6): p. 511-6.
16. Daling, J.R., et al., *A population-based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors*. Gynecol Oncol, 2002. **84**(2): p. 263-70.
17. de Sanjose, S., et al., *Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2007. **7**(7): p. 453-9.
18. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.

19. Delvenne, P., et al., *Detection of human papillomaviruses in paraffin-embedded biopsies of cervical intraepithelial lesions: analysis by immunohistochemistry, in situ hybridization, and the polymerase chain reaction*. Mod Pathol, 1994. **7**(1): p. 113-9.
20. Diebold, J. and D. Mayr, *Histopathologie*, in *Tumormanual*. 2007, Tumorzentrum München.
21. Doorbar, J., *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. Clin Sci (Lond), 2006. **110**(5): p. 525-41.
22. Dyson, N., et al., *The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product*. Science, 1989. **243**(4893): p. 934-7.
23. Ferguson, A.W., S.M. Svoboda-Newman, and T.S. Frank, *Analysis of human papillomavirus infection and molecular alterations in adenocarcinoma of the cervix*. Mod Pathol, 1998. **11**(1): p. 11-8.
24. Fujita, M., et al., *Association of human papillomavirus with malignant and premalignant lesions of the uterine endometrium*. Hum Pathol, 1995. **26**(6): p. 650-8.
25. GEKID. *Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland*. 2007; Available from: <http://www.ekr.med.uni-erlangen.de/GEKID/Atlas/CurrentVersion/Inzidenz/atlas.html>.
26. Ghittoni, R., et al., *The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses*. Virus Genes, 2010. **40**(1): p. 1-13.
27. Giatromanolaki, A., et al., *Human papillomavirus in endometrial adenocarcinomas: infectious agent or a mere "passenger"?* Infect Dis Obstet Gynecol, 2007. **2007**: p. 60549.
28. Gillison, M.L. and D.R. Lowy, *A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer*. Lancet, 2004. **363**(9420): p. 1488-9.
29. Gingelmaier, A., et al., *Expression of HPV, steroid receptors (ERalpha, ERbeta, PR-A and PR-B) and inhibin/activin subunits (alpha, betaA and betaB) in adenosquamous endometrial carcinoma*. Anticancer Res, 2007. **27**(4A): p. 2011-7.
30. Giordano, G., et al., *Endometrial mucinous microglandular adenocarcinoma: morphologic, immunohistochemical features, and emphasis in the human papillomavirus status*. Int J Gynecol Pathol, 2006. **25**(1): p. 77-82.
31. Gredmark, T., et al., *Histopathological findings in women with postmenopausal bleeding*. Br J Obstet Gynaecol, 1995. **102**(2): p. 133-6.
32. Grulich, A.E., et al., *Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis*. Lancet, 2007. **370**(9581): p. 59-67.
33. Guo, M., et al., *Evaluation of a commercialized in situ hybridization assay for detecting human papillomavirus DNA in tissue specimens from patients with cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(1): p. 274-80.
34. Hachisuga, T., et al., *Human papilloma virus and P53 overexpression in carcinomas of the uterine cervix, lower uterine segment and endometrium*. Pathology, 1996. **28**(1): p. 28-31.

35. Haqqani, M.T. and H. Fox, *Adenosquamous carcinoma of the endometrium*. J Clin Pathol, 1976. **29**(11): p. 959-66.
36. Ho, G.Y., et al., *Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women*. N Engl J Med, 1998. **338**(7): p. 423-8.
37. Horn, L.C., et al., *[Current TNM/FIGO classification for cervical and endometrial cancer as well as malignant mixed Mullerian tumors : Facts and background.]*. Pathologe, 2010.
38. Howley, P.M., *Role of the human papillomaviruses in human cancer*. Cancer Res, 1991. **51**(18 Suppl): p. 5019s-5022s.
39. Irwin, M.L., et al., *Effect of exercise on total and intra-abdominal body fat in postmenopausal women: a randomized controlled trial*. JAMA, 2003. **289**(3): p. 323-30.
40. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(5): p. 277-300.
41. Karlsson, R., et al., *Lifetime number of partners as the only independent risk factor for human papillomavirus infection: a population-based study*. Sex Transm Dis, 1995. **22**(2): p. 119-27.
42. Kealy, W.F., et al., *Adenoacanthoma of the endometrium: morphological changes induced by human papillomavirus*. J Clin Pathol, 1990. **43**(7): p. 554-9.
43. Klaes, R., et al., *Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri*. Int J Cancer, 2001. **92**(2): p. 276-84.
44. Koss, L.G. and G.R. Durfee, *Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia*. Ann N Y Acad Sci, 1956. **63**(6): p. 1245-61.
45. Kürzl, R., *Früherkennung*, in *Tumormanual*. 2007, Tumorzentrum München.
46. Kürzl, R., *Prätherapeutische Diagnostik*, in *Tumormanual*. 2007, Tumorzentrum München.
47. Langer, R.D., et al., *Transvaginal ultrasonography compared with endometrial biopsy for the detection of endometrial disease. Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions Trial*. N Engl J Med, 1997. **337**(25): p. 1792-8.
48. Lax, S.F., *Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification*. Virchows Arch, 2004. **444**(3): p. 213-23.
49. Lax, S.F., et al., *The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways*. Cancer, 2000. **88**(4): p. 814-24.
50. Meisels, A. and R. Fortin, *Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns*. Acta Cytol, 1976. **20**(6): p. 505-9.
51. Meissner, J.D., *Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines*. J Gen Virol, 1999. **80** ( Pt 7): p. 1725-33.

52. Mendivil, A., K.M. Schuler, and P.A. Gehrig, *Non-endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus: a review of selected histological subtypes*. Cancer Control, 2009. **16**(1): p. 46-52.
53. Munk, C., et al., *History of genital warts in 10,838 women 20 to 29 years of age from the general population. Risk factors and association with Papanicolaou smear history*. Sex Transm Dis, 1997. **24**(10): p. 567-72.
54. Muñoz, N., et al., *Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective*. Int J Cancer, 2004. **111**(2): p. 278-85.
55. Muñoz, N., et al., *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(6): p. 518-27.
56. Muñoz, N., et al., *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer*. Vaccine, 2006. **24 Suppl 3**: p. S3/1-10.
57. Nebesio, C.L., G.W. Mirowski, and T.Y. Chuang, *Human papillomavirus: clinical significance and malignant potential*. Int J Dermatol, 2001. **40**(6): p. 373-9.
58. Noll S. and S. Schaub-Kuhnen, *Praxis der Immunhistochemie*. 2000, München, Jena: Urban & Fischer.
59. O'Leary, J.J., et al., *Human papillomavirus and mixed epithelial tumors of the endometrium*. Hum Pathol, 1998. **29**(4): p. 383-9.
60. Parazzini, F., et al., *The epidemiology of endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 1991. **41**(1): p. 1-16.
61. Pater, M.M. and A. Pater, *Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix*. Virology, 1985. **145**(2): p. 313-8.
62. Petry, K.U., et al., *Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions*. Int J Cancer, 1994. **57**(6): p. 836-40.
63. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-40.
64. Rodriguez, A.C., et al., *Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(7): p. 513-7.
65. Roteli-Martins, C.M., et al., *Value of morphological criteria in diagnosing cervical HPV lesions confirmed by in situ hybridization and hybrid capture assay*. Pathol Res Pract, 2001. **197**(10): p. 677-82.
66. Rubin, M.A., et al., *Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis*. Am J Pathol, 2001. **159**(4): p. 1211-8.
67. Ryan, A.J., et al., *Endometrial cancer*. Cell Tissue Res, 2005. **322**(1): p. 53-61.
68. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lancet, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
69. Schiffman, M.H., *Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia*. J Natl Cancer Inst, 1992. **84**(6): p. 394-8.
70. Schwarz, E., et al., *Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells*. Nature, 1985. **314**(6006): p. 111-4.

71. Sedlacek, T.V., *Advances in the diagnosis and treatment of human papillomavirus infections*. Clin Obstet Gynecol, 1999. **42**(2): p. 206-20.
72. Semczuk, A., et al., *Detection of human papillomavirus types 16 and 18 in human neoplastic endometrium: lack of correlation with established prognostic factors*. Oncol Rep, 2000. **7**(4): p. 905-10.
73. Sherman, M.E., *Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach*. Mod Pathol, 2000. **13**(3): p. 295-308.
74. Sorosky, J.I., *Endometrial cancer*. Obstet Gynecol, 2008. **111**(2 Pt 1): p. 436-47.
75. Stanley, M., *Prevention strategies against the human papillomavirus: the effectiveness of vaccination*. Gynecol Oncol, 2007. **107**(2 Suppl 1): p. S19-23.
76. Stanley, M.A., M.R. Pett, and N. Coleman, *HPV: from infection to cancer*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 6): p. 1456-60.
77. Steben, M. and E. Duarte-Franco, *Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology*. Gynecol Oncol, 2007. **107**(2 Suppl 1): p. S2-5.
78. Syrjanen, K., et al., *Prevalence, incidence, and estimated life-time risk of cervical human papillomavirus infections in a nonselected Finnish female population*. Sex Transm Dis, 1990. **17**(1): p. 15-9.
79. Tarkowski, T.A., et al., *Epidemiology of human papillomavirus infection and abnormal cytologic test results in an urban adolescent population*. J Infect Dis, 2004. **189**(1): p. 46-50.
80. Tjalma, W.A., et al., *Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2005. **19**(4): p. 469-83.
81. Trimble, C.L., et al., *Heterogeneous etiology of squamous carcinoma of the vulva*. Obstet Gynecol, 1996. **87**(1): p. 59-64.
82. Tumorzentrum, *Manual - Malignome der Corpus uteri*. 2007: München.
83. Tying, S.K., *Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response*. J Am Acad Dermatol, 2000. **43**(1 Pt 2): p. S18-26.
84. Uchiyama, M., et al., *Correlation between human papillomavirus positivity and p53 gene overexpression in adenocarcinoma of the uterine cervix*. Gynecol Oncol, 1997. **65**(1): p. 23-9.
85. Unger, E.R., *In situ diagnosis of human papillomaviruses*. Clin Lab Med, 2000. **20**(2): p. 289-301, vi.
86. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. **189**(1): p. 12-9.
87. Werness, B.A., A.J. Levine, and P.M. Howley, *Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53*. Science, 1990. **248**(4951): p. 76-9.
88. WHO, *Human Papillomaviruses*, in *IARC Monograph on Evaluation of Carcinogenic Risks of Humans*. 1995: Lyon, France. p. 277-82.
89. Wiedorn, K.H., et al., *Comparison of in-situ hybridization, direct and indirect in-situ PCR as well as tyramide signal amplification for the detection of HPV*. Histochem Cell Biol, 1999. **111**(2): p. 89-95.

90. Woodman, C.B., et al., *Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study*. Lancet, 2001. **357**(9271): p. 1831-6.
91. Zehbe, I., et al., *Detection of human papillomavirus in cervical intra-epithelial neoplasia, using in situ hybridization and various polymerase chain reaction techniques*. Virchows Arch, 1996. **428**(3): p. 151-7.
92. zur Hausen, H., *Papillomavirus infections--a major cause of human cancers*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1288**(2): p. F55-78.
93. zur Hausen, H., *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 342-50.
94. zur Hausen, H. and E.M. de Villiers, *Human papillomaviruses*. Annu Rev Microbiol, 1994. **48**: p. 427-47.



## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser (lat. aqua destillata)
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BMI	Body mass index
bp	base pairs
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CIN	Cervical intraepithelial Neoplasia
CISH	Chromogene In-situ-Hybridisierung
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium

DNA	Deoxyribonucleic acid
EIC	endometrial intraepithelial carcinoma
ER	Estrogen Rezeptor
et al.	und andere (lat. et alii)
Excl.	Exclusive
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HC	Hybrid-Capture-Assay
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	high-risk
HRP	Horseradish Peroxidase
Incl.	Inclusive
INK4A	Cyclin-dependent kinase 4A
IRS	Immunoreaktiver Score
ISH	In-situ-Hybridisierung
kb	Kilobase
Kg	Kilogramm
K-ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LCR	long-control-region
LMU	Ludwig-Maximilian-Universität
LR	low-risk
ml	Milliliter
mM	Millimol

MRT	Magnetresonanztomographie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
nm	Nanometer
ORF	open reading frame
Pap	Papanicolaou
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCO	Polyzystisches Ovarialsyndrom
PCR	Polymerase chain reaction
PP	Percentage Points
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SI	Staining Intensity
sog.	sogenannte/r/s
STD	sexual transmitted disease
TBST	Tris-buffered Saline and Tween 20
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
TVU	Transvaginaler Ultraschall
u.a.	unter anderem
U/ml	Unit/Milliliter
URR	upstream-regulatory-region
USA	United States of America

UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
VLP	virus-like-particles
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

## 8.2 Verwendete Materialien

<i>Chemikalien</i>	<i>Hersteller</i>
GenPoint™ Kit, Tyramide signal amplification system für Biotinylated Probes  - Stringenz-Waschkonzentrat - Primäres Streptavidin-HRP-Konzentrat - Primäre Streptavidin-HRP Verdünnungslösung - Biotinyl-Tyramidlösung - Sekundäres Streptavidin-HRP - DAB- Chromogenkonzentrat - DAB-Substratpuffer	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark Code K0620
GenPoint™ HPV Biotinylated DNA Probe for In Situ Hybridization	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark Code Y1443
Biotin Blocking System  - Avidin-Lösung - Biotin-Lösung	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark Code X0590
ZytoFast CISH DNA Implementation Kit  - 1 Pepsin Solution - DNA +/- Control Probes - AP-anti-Biotin - AP-Substrate - Wash Buffer	ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Deutschland, Product No.: T-1052
Human Papilloma Virus (HR) in situ hybridization probe	ZytoVision, Bremerhaven, Deutschland, Product No.: T-1040
PCR Master Mix	Promega, Madison, USA, # M750C
Primer	Metabion, Martinsried, Deutschland

Promega Free Water	Promega, Madison, USA, # P119C
Xylol	Apotheke Innenstadt, LMU München, Pettenkoferstraße
Ethanol 100%,96%,70%	Apotheke Innenstadt, LMU München, Pettenkoferstraße
Aqua destillata	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Proteinkinase K	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Wasserstoffperoxid H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%, AnalaR Normapur	VWR International S.A.S., Briare, Frank- reich
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
TBST (=Trispuffer Saline + Tween)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Saures Hämalaun (nach P. Mayer)	Apotheke Innenstadt, LMU München, Pettenkoferstraße
Kernechtrot	Merck, Darmstadt, Deutschland
Vitro Clud Einschlussmittel	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Aquatex®	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dulbecco's MEM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
1 M Kalium-Chlorid (= 7,456g KCl auf 100ml Aqua dest.)	Merck, Darmstadt, Deutschland
1 M Magnesium-Chlorid (= 20,33g MgCl <sub>2</sub> auf 100ml Aqua dest.)	Merck, Darmstadt, Deutschland
1 M Tris/HCl	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Phenol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Chloroform	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Isoamylalkohol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
NaAc	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eisessig Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Loading Dye Solution	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland, #R0611
4%iges Agarose-Gel E-Gel® EtBr	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, #F13117

<i>Ge- und Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Hersteller</i>
Objektträger Superfrost® Plus und Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Research Pipette und Pipettenspitzen ep TIPS	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotina 380	Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Laborgefrierschrank Forma 900 Series	Therma Scientific, Waltham, USA
Schlittenmikrotom Hn40	Reichert- Jung, Heidelberg, Deutschland
Hybridofen HYBrite <sup>TMb</sup>	VYSIS, jetzt Abbott GmbH und Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland
Fixogum	Marabu GmbH und Co. KG, Bietigheim- Bissingen, Deutschland

Lichtmikroskop Diaplan	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Kamera KY-F55B	JVC Victor Company, Japan
Vortex Genie 2 <sup>TM</sup>	Bender und Hobein, Zürich, Schweiz
Master-Cycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Image Station	Bio-Rad, München, Deutschland



### 8.3 Klassifizierung des Endometriumkarzinoms nach TNM und FIGO (2009)

TNM-Stadium	FIGO	Beschreibung
<b>T-Tumorstadium</b>		
TX		Unklarer Primärtumor
T0		Primärtumor nicht darstellbar
Tis		Carcinoma in situ
<b>T1</b>	<b>I</b>	<b>Tumor auf Corpus uteri begrenzt</b>
T1a	IA	Keine oder Invasion von <50% des Myometriums
T1b	IB	Tumor infiltriert ≥50% des Myometriums
<b>T2</b>	<b>II</b>	<b>Tumor infiltriert das Stroma der Zervix uteri ohne Organüberschreitung</b>
<b>T3</b>	<b>III</b>	<b>Lokale oder regionale Ausbreitung</b>
T3a	IIIA	Tumor infiltriert die Serosa u/o die Adnexe
T3b	IIIB	Infiltration der Vagina u/o Parametrien
T3c/N1	IIIC	Pelvine u/o paraaortale Lymphknotenmetastasen
	IIIC1	positive pelvine Lymphknoten
		positive paraaortale Lymphknoten mit oder ohne pelvine Lymphknotenmetastasen
	IIIC2	
	IV	Tumor infiltriert Blase/Darm u/o Fernmetastasen
	<b>IV</b>	<b>Infiltration der (nichtgenitalen) Nachbarorgane u/o Fernmetastasen</b>
<b>T4</b>	IVa	Tumor infiltriert Blasen- u/o Darmmukosa
<b>M1</b>	IVb	Fernmetastasen (s.u.)
<b>N-Regionäre Lymphknoten</b>		
NX		Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1		positive Regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>M-Fernmetastasen</b>		
M0		Keine Fernmetastasen
		Fernmetastasen (exkl. Metastasen in der Vagina, der Beckenserosa oder den Adnexen, inkl. Metastasen in inguinalen Lymphknoten u/o in anderen intraabdominalen Lymphknoten als den paraaortalen u/o Beckenlymphknoten)
M1		

[13, 37]

## 8.4 Grading

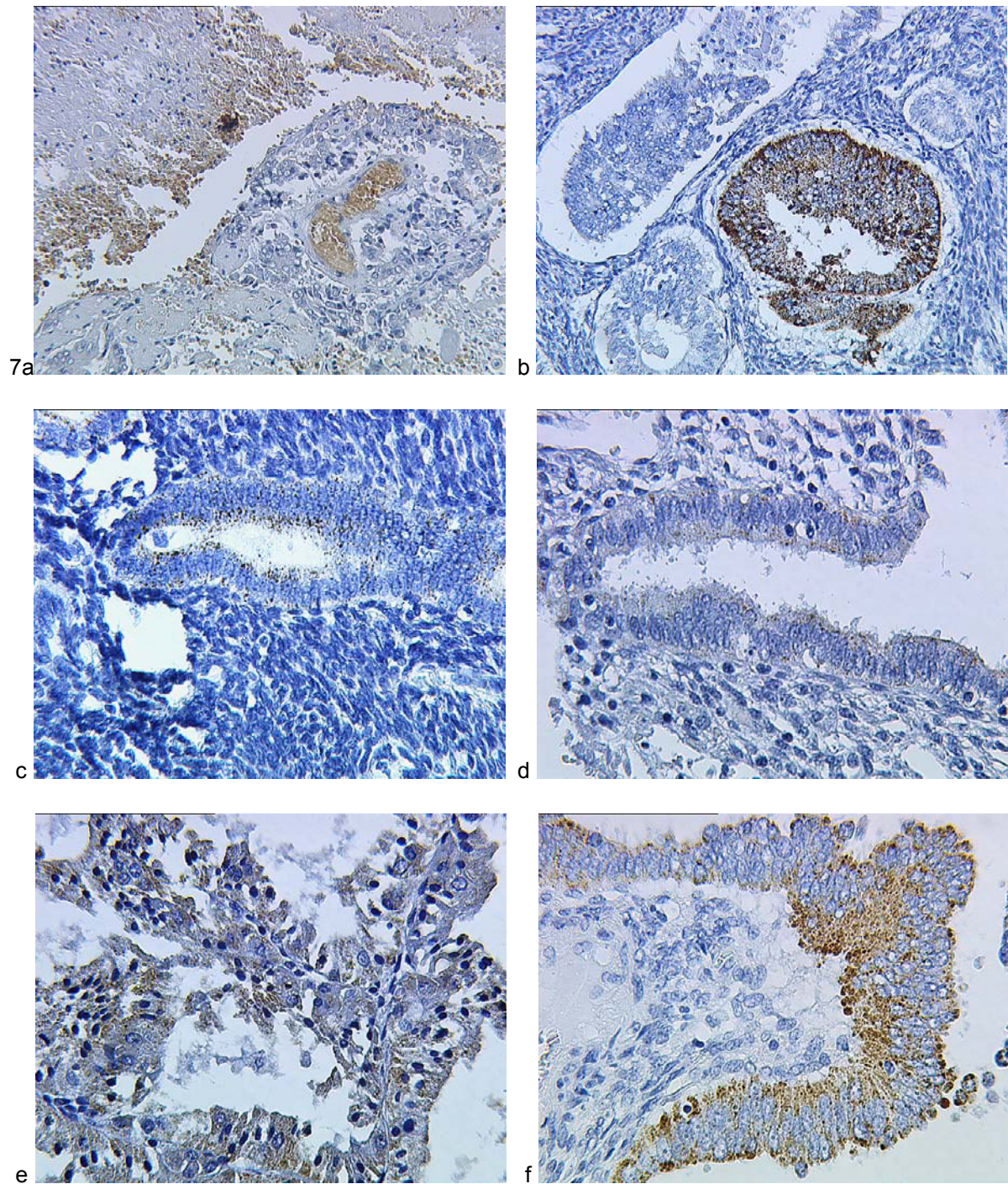
Der Differenzierungsgrad des Tumors wird durch das sog. Grading beurteilt. Die im Folgenden beschriebene Einteilung beruht auf einem Konsens der FIGO von 1988 und wird bei endometrioiden Tumoren angewandt. Der Tumor wird auf Grund des Prozentsatzes an soliden nicht plattenepithelialen Tumoranteilen eingestuft:

Grade 1	≤ 5% solider glandulärer Tumor (= gut differenziert)
Grade 2	6-50% solider glandulärer Tumor (= mäßig differenziert)
Grade 3	> 50% solider glandulärer Tumor (= wenig differenziert)

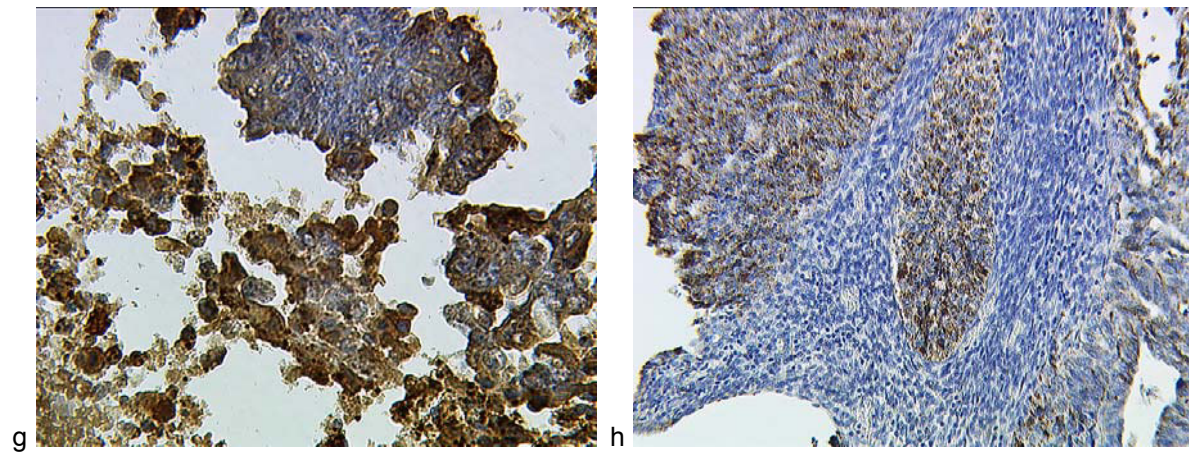
Zusätzlich muss der Nachweis von Kernatypien berücksichtigt werden. Der Tumorgrad wird um eine Stufe angehoben, falls höhergradige Kernatypien nachgewiesen werden [10] [20].

Im Falle des Vorliegens eines Typ-II-Karzinoms (klarzellig oder serös) sind für das Grading die nukleären Atypien maßgeblich [37].

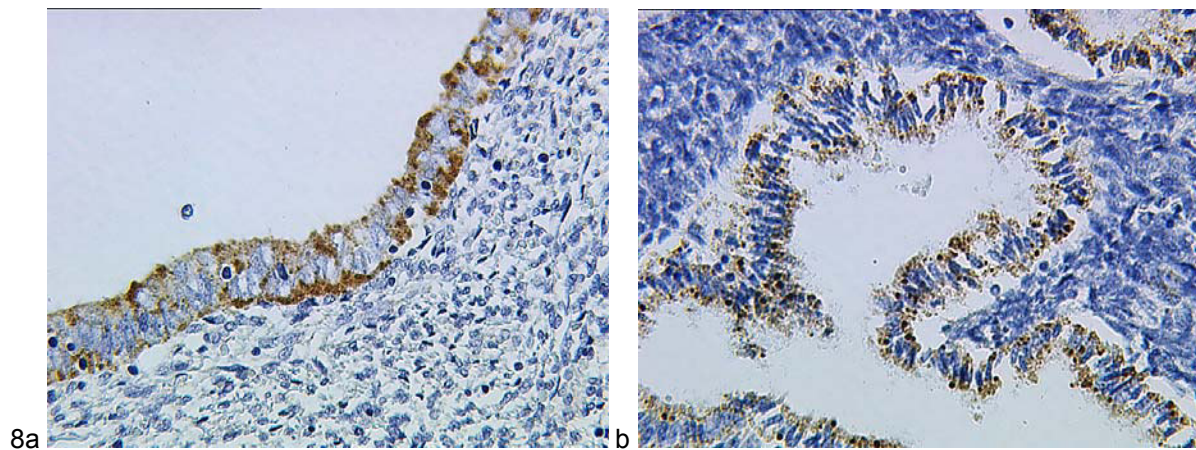
## 8.5 Bilderauswahl



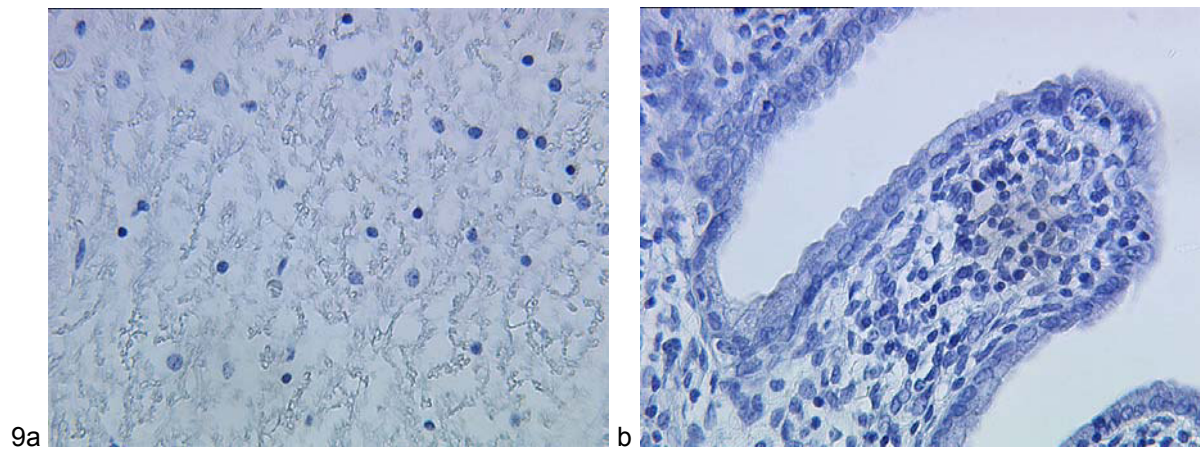




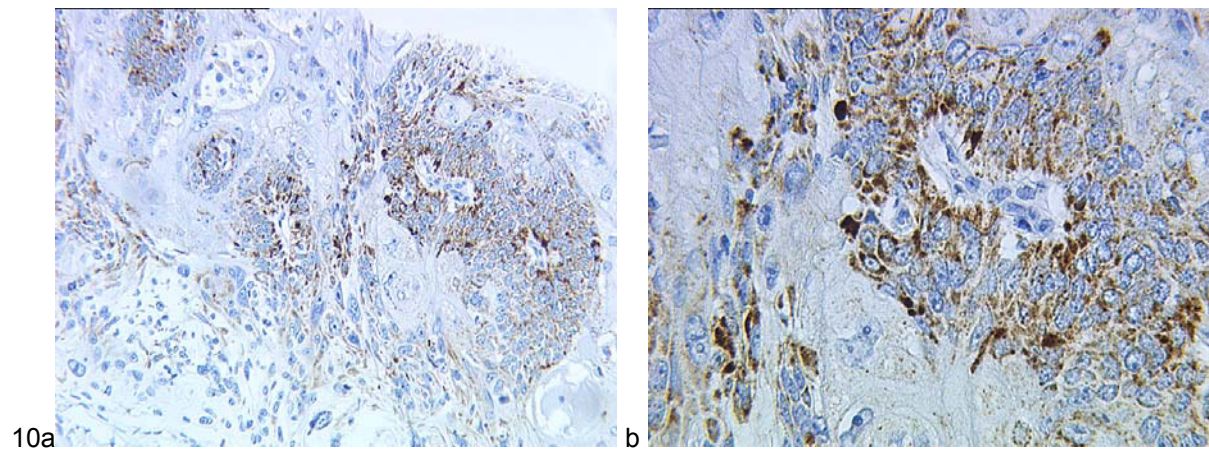
**Abb. 7a-h:** Nachweis von HPV-DNA durch ISH in malignem humanem Endometriumgewebe. a falsch positive Farbreaktion durch Erythrozyten in einem endometrioiden Adenokarzinom, 100x Vergrößerung. b im Kontrast dazu eine deutlich richtig positive Färbung mit einem IRS von 2/12 in einem endometrioiden Adenokarzinom, 100x Vergrößerung. c schwache Farbreaktion, IRS 1/12, endometrioides Adenokarzinom, 250x Vergrößerung. d schwache Farbreaktion, IRS 1/12, muzinöses Karzinom, 250x Vergrößerung. e schwache Farbreaktion, IRS 2/12, klarzelliges Karzinom, 250x Vergrößerung. f mittelstarke Farbreaktion, IRS 4/12 seröses Ca, 4/12, 250x Vergrößerung. g mittelstarke Farbreaktion, IRS 6/12, adenosquamöses Karzinom, 250x Vergrößerung. h mittelstarke Farbreaktion, IRS 4/12, undifferenziertes Karzinom, 250x Vergrößerung.



**Abb. 8a-b:** Episomale und integrierte HPV-DNA. a Nachweis episomaler HPV-DNA in einem muzinösem Endometriumkarzinom. b Nachweis integrierter HPV-DNA in einem serösen Endometriumkarzinom.

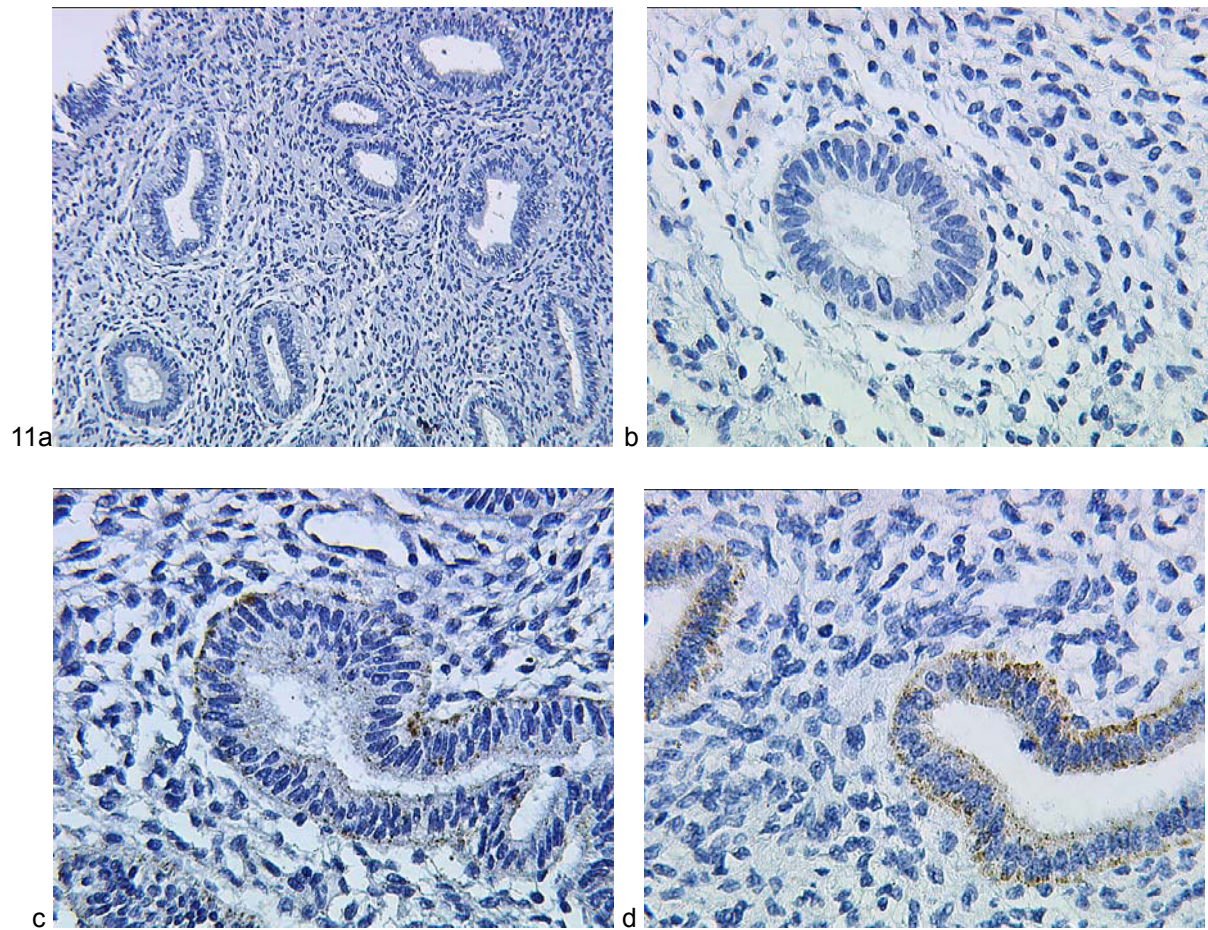


**Abb. 9a-b:** Negativkontrollgewebe. a Hirngewebe, 250x Vergrößerung. b normales Zervixgewebe, 250x Vergrößerung



**Abb. 10a-b:** Positivkontrollgewebe. a Zervixkarzinom, 100x Vergrößerung. b Zervixkarzinom, 250x Vergrößerung





**Abb. 11a-d:** Nachweis von HPV-DNA in normalem humanen Endometriumgewebe. a keinerlei Farbreaktion, IRS 0/12, 100x Vergrößerung. b keinerlei Farbreaktion, IRS 0/12, 250x Vergrößerung. c, d leichte lokale Farbreaktion, IRS 1/12, 250x Vergrößerung.

## **8.6 Vorabpublikationen**

Teilnahme am 14. Hamburger Symposium über Tumormarker mit einem Vortrag, Dezember 2008

Montag M., Blankenstein T.J., Shabani N., Brüning A., Mylonas I.: Evaluation of two commercialised in situ hybridisation assays for detecting HPV-DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Archives of Gynecology and Obstetrics (2011 Oct; 284 (4): 999-1005)

## **8.7 Danksagung**

Ich danke Herrn Professor Dr. Ioannis Mylonas für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der erforderlichen Mittel und die stets wertvolle wissenschaftliche Beratung. Zudem möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich einen Teil meiner Ergebnisse im Rahmen des 14. Hamburger Symposiums für Tumormarker vorstellen durfte und als wissenschaftliches Paper veröffentlichen konnte.

Mein besonders herzlicher Dank geht an Dr. Thomas Blankenstein für die Einführung in die Thematik und die zahlreichen Anregungen. Vor allem aber für die ausgezeichnete Betreuung und kontinuierliche Beratung.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Naim Shabani (Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilian-Universität München) für die Überprüfung der histologischen Zuordnung und Klassifizierung der verwendeten Karzinomproben.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Frau Sandra Schulze, Frau Christina Kuhn und Frau Susanne Kunze für die Einarbeitung in die Methodik, die geduldige Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Nicht zuletzt bedanke ich mich auch bei meiner Familie ohne die das Medizinstudium nicht möglich gewesen wäre. Nur mit deren wesentlicher Unterstützung und unendlicher Geduld konnte die vorliegende Arbeit entstehen.

# Eidesstattliche Versicherung

Montag, Maresa

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Experimenteller Nachweis von HPV-DNA im Endometriumkarzinom

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Köln, 15.12.2015

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand